

〔家畜・家禽における遺伝子マーカーに関する研究〕

高橋秀彰

(1997 年 9 月 1 日受理)

農業生物資源研究所 遺伝資源第一部 305-8602 茨城県つくば市観音台

Synopsis

In this thesis, two types of repeated sequences, short interspersed repetitive elements (SINEs) in pigs and microsatellite sequences in chickens, were molecularly cloned and studied their usages as DNA markers in genetic mapping and understanding of phylogenetic relationship between closely related breeds. The data shows that SINEs and microsatellite sequences are useful tools for genetic analyses in livestock animals and poultry.

Key words: livestock, poultry, SINEs, microsatellites, genetic mapping, DNA marker

目 次

第 1 章 緒 言	14
第 2 章 ブタの散在型反復配列 (PRE-1 配列) の単離と構造解析	15
2.1 緒 言	15
2.2 材料と方法	15
2.3 結 果	18
2.4 考 察	20
第 3 章 ブタ散在型反復配列 (PRE-1 配列) の遺伝連鎖マーカーとしての有用性の検討	23
3.1 緒 言	23
3.2 材料と方法	24
3.3 結 果	25
3.4 考 察	28
第 4 章 ニワトリのマイクロサテライト DNA の効率的単離法の開発	29
4.1 緒 言	29
4.2 材料と方法	29
4.3 結 果	32
4.4 考 察	32
第 5 章 マイクロサテライト DNA マーカーを用いた日本鶏の類縁関係の分析	36
5.1 緒 言	36
5.2 材料と方法	36
5.3 結 果	40

5.4 考察	40
第6章 総合考察	45
謝 辞	47
摘 要	48
引用文献	49
Summary	53

第1章 緒 言

ヒトでは、遺伝病の遺伝様式あるいはそれを支配する遺伝子を明らかにすることを目的として、多くの遺伝子が単離され、それらをマーカーとして用いた遺伝連鎖解析を行うことによって、遺伝病関連あるいは支配遺伝子と連鎖するマーカー遺伝子が明らかにされつつある (Cohen ら 1990)。一方、家畜・家禽の経済性に関係のある形質 (産肉量、増体量泌乳量、産卵数など) の多くは量的形質遺伝子座 (quantitative traits loci, QTL) 上の効果の小さな多数の遺伝子群 (ポリジーン) に支配され、さらに環境などの影響を受けて形質として発現すると考えられている (山田 1978)。これまでの量的形質の選抜では、個々の遺伝子の把握が困難であり、遺伝子そのものによる選抜ではなく、統計遺伝学的理論に基づく表現型値による選抜が行われてきた (山田 1978)。

近年、分子遺伝学的手法の発展に伴い、家畜・家禽においてもゲノム研究が始まり、特定の遺伝子の単離、構造および機能解析、染色体上への位置付け (マッピング) などが急速に進められている (INRA 1996)。さらに、経済形質関連あるいは支配遺伝子と連鎖する遺伝的マーカーの情報を利用することによって、さらに効率的な選抜法が開発されるものと期待されている。このような遺伝的マーカーを指標とした選抜は、一般にマーカーアシスト選抜 (Marker-assisted selection, MAS, Smith 1967) と呼ばれている。この前段階として、多くの遺伝的マーカーによって構成される詳細な遺伝連鎖地図の作製が必要不可欠であるが、家畜・家禽の遺伝連鎖地図作製は、ヒトに比べてはるかに遅れている (農林水産省農林水産技術会議事務局 1994)。

遺伝連鎖地図は、DNA 多型マーカーを用いた家系分析によって構築される。多型性の高い DNA マーカーを用いれば、家系分析で有意な情報を得られる確率が高い。したがって多型性の高い DNA マーカーを多数準備することが、精度の高い遺伝連鎖地図作製にとって重要である。しかしながら家畜・家禽では、家系分析に必要な DNA 多型マーカーの数がいまだ不十分である (農林水産省農林水産技術会議事務局 1994)。また家系分析では、必然的に多数の DNA 検体を分析しなければならないので、簡便な多型検出法を用いることが重要である。従来、RFLPs (restriction fragment length polymorphisms, 制限断片長多型) をサザンハイブリダイゼーション法 (Southern 1975) を用いて検出し、連鎖解析を行っていた。しかし、この方法を用いた多数の検体の処理には、多大な労力と費用が必要である。そこで、簡便かつ安価な PCR 法 (polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応, Saiki ら 1985) を利用した多型検出法が重要視されるようになった。したがって、家畜・家禽の遺伝連鎖地図作製においても、DNA マーカーの多型を PCR 法を利用して検出する方法が効率的であると考えられる。

真核生物のゲノム DNA 中には、機能的役割がはっきりしないが何度も繰り返し出現する反復配列が存在する (Britten と Kohne 1968)。反復配列は、その存在様式によって、ゲノム中に散らばって分布する散在型反復配列と、ゲノム中に偏って分布する直列型反復配列に大別される。直列型反復配列は、その反復単位のサイズによって、数百塩基対 (bp; base pairs) の単位から構成されるサテライト DNA と数十 bp の単位から構成されるミニサテライト DNA に分けられる。散在型反復配列も同様に、反復単位のサイズによって数百 bp から構成される SINEs (short inter-

spersed elements) と数キロ bp から構成される LINEs (long interspersed elements) に分けられる (Singer 1982; Willard と Waye 1987). この他に、染色体末端に存在し、6 bp の反復単位から構成されるテロメア配列 (Moyzis ら 1988) や、マイクロサテライト DNA (Rogers 1983) などが知られている。マイクロサテライト DNA は、2~数 bp の単純な配列が連なっている点で直列型反復配列に分類されるが、ゲノム中に散らばって分布している点から、散在型反復配列ともいえる。

ヒトの SINEs である Alu 配列やマイクロサテライト DNA は、多型性に富んでいる。また、これらは PCR 法での増幅に適した数百 bp 以下のサイズであることから、DNA 多型マーカーとして広く利用されている (Weber 1990; Iizuka ら 1992). そこで、家畜・家禽においても、散在型反復配列、特に SINEs やマイクロサテライト DNA をマーカーに用いた遺伝連鎖地図作製が期待される。しかしながら、これまで報告された家畜・家禽の SINEs には、塩基配列、反復単位の数、反復頻度などについて、種間に共通性はほとんど認められない (Stumph ら 1981; Singer ら 1987; Lenstra ら 1993; Sakagami ら 1994). このことは、家畜・家禽種ごとに SINEs を単離し、構造解析を行う必要性を示している。また、特定の SINEs やマイクロサテライト DNA を増幅する PCR のプライマーの設計には、それらに近接する領域の塩基配列の情報が必要である。そこで、SINEs やマイクロサテライト DNA を、その近傍領域を含む形で効率的に単離し、構造解析を行うことが重要である。

本研究においては、家畜・家禽の DNA 多型マーカーとして利用可能な反復配列の検索と単離、およびその多型検出法に関する一連の研究を行った。第2章では、ブタにおける SINEs の単離およびその構造解析について論述する。第3章では、第2章で明らかにしたブタの SINEs の多型検出法の開発と、DNA 多型マーカーとしての有用性について論述する。第4章では、ニワトリを材料に用いたマイクロサテライト DNA の効率的な単離法の開発について論述する。第5章では、マイクロサテライト DNA 多型に基づく日本鶏の類縁関係の解析について論述する。第6章では、反復配列の DNA 多型マーカーとしての有用性について総合考察する。

第2章 ブタの散在型反復配列 (PRE-1 配列) の単離と構造解析

2.1 緒言

真核生物のゲノムは多くの反復配列を含んでいる。反復配列は、その存在様式によって、ゲノム中に散らばって分布する散在型反復配列と、ゲノム中に偏って分布する直列型反復配列に大別される (Britten と Kohne 1968). 散在型反復配列は、反復単位の数によって数百 bp から構成される SINEs (short interspersed elements) と、数キロ bp から構成される LINEs (long interspersed elements) に分けられる (Singer 1982; Willard と Waye 1987).

ヒトの SINEs として Alu 配列が有名である (Rinehart ら 1981). Alu 配列は多型性に富んでおり、ヒトの連鎖地図作製のための DNA 多型マーカーとして利用されている (Iizuka ら 1992). 家畜においても SINEs は、DNA 多型マーカーとしての有効性が期待される。家畜の SINEs についての詳細な研究は、ウマ (Sakagami ら 1994) とウシ (Lenstra ら 1993) を中心に行われている。一方、ブタでは、(Singer ら 1987) が MHC (主要組織適合性複合体) クラス I 遺伝子中に SINEs を見だし、これを PRE-1 (Porcine Repeated Elements-1) 配列と名づけたが、ゲノム中のコピー数や、塩基配列のバリエーションの程度などについて不明な点が多い。そこで本研究では、PRE-1 配列の構造解析を行った。

2.2 材料と方法

2.2.1 ブタのゲノム DNA の調製

農林水産省畜産試験場で繁殖されている梅山豚、ハンプシャー、ランドレース、大ヨークシャー、デュロック各1頭の精液(精子)から、Ishibashi ら (1980) の方法を用いてブタのゲノム DNA を調製した。

2.2.2 使用した酵素

制限酵素は東洋紡、宝酒造およびベーリンガー・マンハイム社製のものを使った。Exonuclease III, T4 DNA リガーゼおよびT4 ポリヌクレオチドキナーゼは宝酒造社製のものを使った。Mung Bean スクレアーゼおよびDNA ポリメラーゼI (Klenow fragment) は東洋紡社製のものを使った。全ての酵素は、各社が推奨する反応条件で使用した。

2.2.3 合成オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドは、DNA 合成機 (Gene Assembler, ファルマシア) を用いて化学合成した。合成したオリゴヌクレオチドは、15% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、目的のサイズのパンドを回収・粉砕し、ゲルの約2倍容量の Elution バッファー (0.5 M 酢酸アンモニウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) を加えて、37℃ で3時間インキュベートした。ついで、14,000 rpm, 4℃ で5分間遠心して上清を回収した後、常法 (Sambrook ら 1989) にしたがって、フェノール抽出、エタノール沈殿を行い精製した。

2.2.4 DNA 断片のアイソトープ標識

ブランクハイブリダイゼーションおよびサザンブロットハイブリダイゼーションに用いたプローブ DNA は、Feinberg と Vogelstein (1983) のランダムプライマー法を用いて³²P 標識した。すなわち、DNA を沸騰水中で5分間熱変性した後、6塩基からなるランダムな配列の合成オリゴヌクレオチド (ランダムプライマー) と DNA を混合し、アニールさせた。ついで、[α -³²P]dCTP を含む各種ヌクレオチド (dNTPs) 存在下で、DNA ポリメラーゼI による伸長反応を行い、³²P 標識 DNA を合成した。ドットハイブリダイゼーションに用いた合成オリゴヌクレオチドは、[γ -³²P] ATP 存在下で T4 ポリヌクレオチドキナーゼを作用させて、5' 末端を³²P 標識した (Sambrook ら 1989)。

2.2.5 反復配列を含むブタ DNA 断片のクローニング

まず、Enquist と Stenberg (1979) の方法にしたがって、ラムダファージを用いたブタのゲノムライブラリーを作製した。すなわち、ブタゲノム DNA を制限酵素 Eco RI で切断後、ラムダファージベクター Charon 4 A の Eco RI アームに連結させた。これを、*in vitro* でラムダファージ粒子に取り込ませた (*in vitro* パッケージング) 後、大腸菌 NM 522 に感染させて LB 寒天培地 (1% バクトトリプトン, 0.5% イーストエキストラクト, 1% NaCl, 3% アガー, pH 7.2) に展開し、組み換えラムダファージのブランクを得た。これをブタのゲノムライブラリーとした。

次に、Benton と Davis (1977) の方法にしたがってブランクハイブリダイゼーションを行い、ブタのゲノムライブラリーをスクリーニングした。まず、寒天培地にニトロセルロースメンブレン (BA 85, Schleicher and Schuell) を置き、ブランクを写しとった。ついで、³²P 標識したブタゲノム DNA をプローブに用いて、6×SSC (Standard Saline Citrate, 1×SSC は 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム), 40% ホルムアミド, 5×Denhart 液 (1×Denhart 液は 0.2% ウシ血清アルブミン fraction V, 0.2% ポリビニルピロリドン, 0.2% Ficoll 400), 100 μ g/ml 変性ニシン精子 DNA, 0.1% SDS 存在下で、42℃、一晩ハイブリダイゼーション反応を行った。その後、メンブレンを 2×SSC-0.1% SDS を用いて、室温で30分間、0.1×SSC-0.1% SDS を用いて、42℃ で30分間洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

反復配列を含むクローンの選択は、以下の戦略で行った。まず、ラムダファージのブランクを写しとったメンブレンにおいて、各クローンが全て同じ DNA 量である、と仮定した。その場合、ハイブリダイゼーション後の各クローンのシグナル強度は、各クローンとハイブリダイゼーションするプローブの量に比例する。本実験ではブタゲノム DNA をプローブに用いたので、全てのクローンが陽性シグナルを示すが、反復配列を含むクローンはそれを含まないクローンよりも、プローブ DNA が多量にハイブリダイゼーションするので強い陽性シグナルを示すと推測される。このようにして、特に強い陽性シグナルを示すクローンを選択した。

ラムダファージにクローニングされた DNA 断片に対して、制限酵素 (*Bam* HI, *Bgl* II, *Cla* I, *Hin* cII, *Hin* dIII および *Sma* I) を作用させ、出現する DNA 断片の長さから制限酵素認識部位の相対的な位置を求めて、制限酵素地図を作製した (Sambrook ら 1989)。制限酵素地図を基に、クローニングされた DNA 断片を複数の制限酵素の組合せ (例えば *Sma* I と *Bam* HI, *Hin* dIII と *Hin* cII) を用いて消化し、アガロースゲル電気泳動を行った。これを、ニトロセルロースメンブレンにサザンブロットし (Southern 1975)、ブタゲノム DNA をプローブに用いたハイブリダイゼーションを行って、強い陽性シグナルを示す DNA 断片を絞り込んだ。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は、ブランクハイブリダイゼーションと同じ条件で行った。ついで、強い陽性シグナルを示す DNA 断片を、プラスミドベクター pBluescript KS+ および SK+ (Stratagene, 以下 pBS KS+ および SK+) の、各 DNA 断片を生じた制限酵素に対応するマルチクローニングサイトにサブクローニングした。

2.2.6 DNA 塩基配列の決定

反復配列を含む pBluescript クローンの欠失変異体を、Exonuclease III/Mung Bean スクレアーゼシステム (#200330, #600041 および #600052, Stratagene) のマニュアルにしたがって作製した。その原理を模式的に図 2-1 に示した。まず、挿入 DNA 断片の T7 プロモーター側にある 3' 末端突出酵素 (pBS KS+ では *Sac* I, pBS SK+ では *Kpn* I) と 5' 末端突出酵素 (pBS KS+ では *Bam* HI, pBS SK+ では *Xho* I) を用いてプラスミドを切断した。ついで、3'→5' exonuclease 活性を持つ Exonuclease III を用いて、一方向に分解後、一本鎖 DNA 特異的分解酵素 Mung Bean スクレアーゼを用いて、末端を平滑化した。これを T4 DNA リガーゼを用いて自己連結させた後、大腸菌 NM 522 に形質転換して欠失変異体クローンを得た。

次に、Exonuclease III/Mung Bean スクレアーゼシステムのマニュアルにしたがって、各欠失変異体クローン的一本鎖 DNA を調製した。まず、各欠失変異体クローンを 2×YT 培地 (1.6% バクトトリプトン, 1% イーストエキストラクト, 1% NaCl, pH 7.2) に接種して、37℃ で一晩振盪培養した後、このうちの 300 μl を 3 ml の 2×YT 培地に接種した。これにヘルパーファージ M13 K07 を m.o.i (multiplicity of infection) = 10~20 (phages to cells) で感染させて、37℃

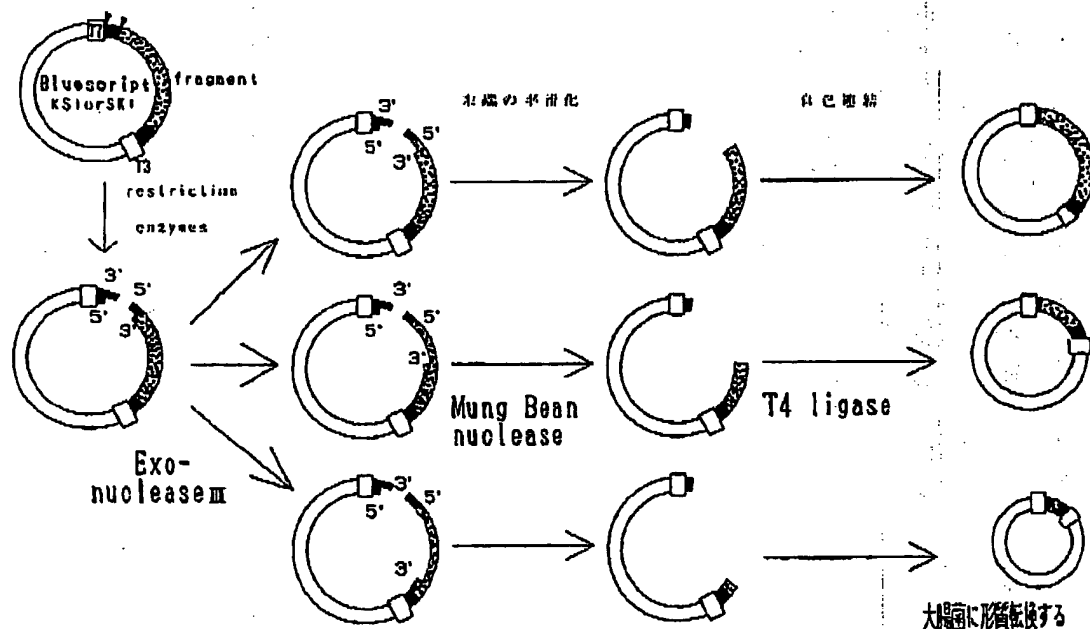


図 2-1 Exonuclease III/Mung Bean スクレアーゼシステム

で一晩振盪培養を行った。培養上清を遠心分離によって回収した後、培養上清の5分の1容量のPEG/NaCl溶液(20%ポリエチレングリコール6000, 2.5 M NaCl)を加えて、室温で15分静置することによって組み換えファージを沈殿させた(Sambrookら 1989)。沈殿を遠心分離によって回収し、TEバッファー(10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA)に溶解した。これを常法にしたがってフェノール抽出、エタノール沈殿することによって、一本鎖DNAを調製した(Sambrookら 1989)。

自動DNAシーケンサー(model 370 A, Applied Biosystems)のマニュアルにしたがい、上述の方法で調製した一本鎖DNAを鋳型として用いたジデオキシ反応(Sangerら 1977)を行って、各欠変異体のサンプルを調製後、自動DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。各欠変異体から得られた塩基配列を、コンピュータソフト(GENETYX)を使って重ね合わせることによって、サブクローニングしたDNA断片の全長の塩基配列を決定した。

2.3 結果

上述した方法によって、反復配列を含む2個のラムダファージクローン、A(約6.2 kb)およびB(約9.5 kb)を選択した。その制限酵素地図を図2-2に示した。ブタゲノムDNAをプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション解析の結果、図2-2で網掛けで示したDNA領域の陽性シグナルが強く、反復配列を含んでいると推測された。そこで、クローンAからBam HI/Sma I断片(約0.8 kb)、クローンBからHinc II断片(約2.1 kb)とEco RI/Cla I断片(約0.7 kb)の3つのDNA断片を選択し、その塩基配列を決定した(図2-3)。その結果、3つのDNA断片には、3'末端にポリA配列を持つ、長さ約230 bpのSINEs(short interspersed elements)に分類される反復配列が、合計6個存在することが明らかになった(図2-3および4)。DNAデータベース(GenBank)検索を行ったところ、これらはSingerら(1987)が報告した'PRE-1配列'と高いホモロジーを示し、そのファミリーに属すると思われる。本研究で明らかにした6個のPRE-1配列を、便宜上、DOS 1~6(DOMestic Swine repeats)と呼ぶことにする。DOS 1~6の塩基配列を基に、PRE-1配列のコンセンサス配列を作製した(図2-5)。

DOS 1~6配列相互あるいは他のDNA配列とのホモロジーを、コンピュータソフト(GENETYX)を使って比較した。その結果、DOS 1~6間のホモロジーは68~85%であった。また、DOS 1~6をSingerら(1987)が報告したコンセンサス配列と比較したところ、そのホモロジーは70~84%であった。また、PRE-1配列の15~74番目の塩基配列は、ウシ肝臓アルギニンtRNA(68%, Keith 1984)、ショウジョウバエのアルギニンtRNA(75%, Frendeweyら 1985)

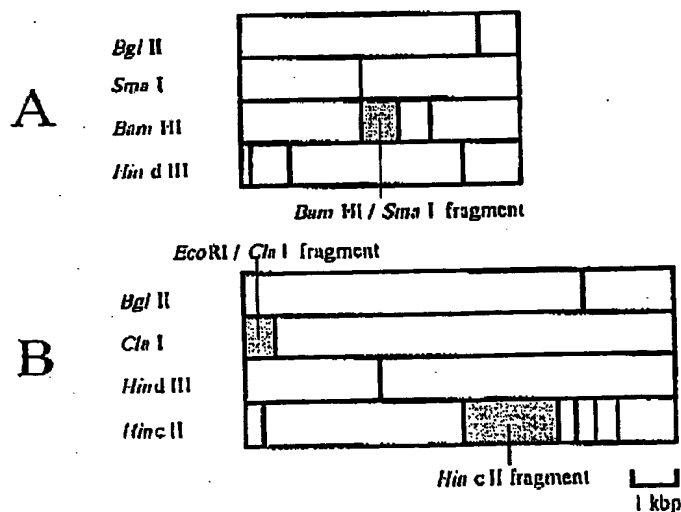


図2-2 選択したλファージクローンの制限酵素地図

Hinc II 断片

1 5'-AACGAATCCGACTCGGAACCATGAGGTTGCAGTTTCGGTCCCTCGCCTTGCTCAGTTGGTTAAGGACCCG
 71 GCCTTTGCCGGTCAGATCCCTTGCTGAGGCTCTGGAGAAGTCCGGTGGCTACGGCTCTGATTAGACCC
 141 CTAGTCTGGGAACCTCCATATGCCGAGGAGTGGCCCTAGAAAAAGCAAAAAAATAAAAAATAAAAAA
 211 AAATGCTTATCTGAAGCTGCATATATAAGTTAATTAATAAAAGCCAAGAGAGAGACATAGCATGTAGGGG
 281 AGCCACATGCTTCCCTTCATAAGCAAAAGTTGGAAGTTTTTTTTTTGGTTTTTCAGGGCCACACTTGCA
 351 GCATATGGAGGTTCCCAAGGCTAGGGGCTAATCAGAGCTACAGCTGCCAGCTACGCAACAGCCAAAGCAA
 421 TGCTAGATCAAAAGCCTCATCTGCTATCTAAACCAAGCTCATGCAATGCCGGATCCTTAACCTACTGAGC
 491 AAGGCAAGGATCGAAGCCGCAACCTTATAGTTCCCTAGTCCAATTTCTGTTTTCTGGGCCACAATAGGA
 561 ACTCCCCCTTCATTTTTTAAAAAGTGTTCAAAAGGAAAAACATGACCCAAAGATTCACAGAGAGGAATA
 631 TATGTATGAAGCTATATAGAAAGATGACCTGAATGGATCTAACCAAGAAAAGTAATTTCTGAAAGGCATC
 701 AGCCTACCAAACTAAAGCTGAATCGTTATATAAAATGTACAGACTTGTTAAAAATATATTTCCCTCTTTA
 771 ATCATAAGATGTCTTTATCTTCTCCAAGATGCTCTTAATTTTCACTTCAGATGTCTGAAGTGCAATATG
 841 AAATCCTCCCATGAAGTACATACAAATATTAGGCAAAATTTCAAACTAAATGAAAAAGAAATTACCCC
 911 GCAGCTCAGTTAAAAATGTCTATTTCTGCTCAAGAAATAGCTTCAAGTTGCGTAGCATATGAATCTACATC
 981 ATAGTCTACTTCTTCAGTCTCTCCAGGAGAGCCTTTTCATCTTCAAGCCATCGAATAGATTCCCTAAAAAT
 1051 GAACATCCCCGAAAAAAGGAAAAAATAAATCAGCACTCCCAATAGCCCTTAAGACAGAAAAAC
 1121 CAATTTACAAATTTTATGTTTTATATACTCAACCATACTCAATATGGTCTCTCTAAATATTAGCAA
 1191 CCATAAAATATCTTTATTTACAAAGTAAAAATTAGGAACATTTCCCTTAAATTTGAACACAAACACAGATA
 1261 TACTACTAGGCTAAACAAGAAGACTTCATCTTATTTTACAGGAGAGGTTTGGGAGAGGGAATGAATCAA
 1331 ACAGAAACACACACACACACCAATGAGCAGGATAAATCTAGAACCTCAACAACATATCCCTAAAACAA
 1401 AGAGAGAATGAATATAATAGTAAGTCTGCAACTTGAGGCCTCTGGAACCTAGAAGTTGTAAGTTATCTGG
 1471 AATTTGAGGCCTCTCAGTGGTTGGCCCAAGAGGTAATCCTAAATCTAAACATTACCTCTTCAACATTTT
 1541 GACTATAAGGGACCAATGGCTAGCCCATTTTAGAAGAGTCAATGAACCACTAAATAGTAGCTACTTGT
 1611 ACTATTCAATAACTTTAAGGAAAGCCTTTATCTTAACTGATTTAGATATGTGGAAATTTATGAGTTT
 1681 CATTTCTTAAGAAATATCTGAATCATATGGATTAAAGGTAAGATCATTTCTAAATTAATTTTGGATA
 1751 TAAAAATGGACATTTTCTATTTTATGCAACATATAACTTCACTTTTCCAAACATCAATGCAATTTAATG
 1821 TATAACAGGCCATGAATCATCTATTAGAAAACATGCAATTAAGTTTACACATATACACACACAC
 1891 CAATATTTTCTTTTCTTCTCAGCTATACATTAATTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTGGCTTTTCTAGG
 1961 GCGGTTCCACGGCATACGGAGGTTCCAGGCTAGGGGTGGAATCGGAGCTGTAGCACCACCTATGCCAG
 2031 AGCCACAGAAACGAGGATCCAAGCCACATCTGCAACCTACAGCACAGCTACAGCAATGCCGATCCTT
 2101 AACCGACTGAGCAAGGCCAGGGATTGAACCTGCAACCTCATGTTCTAGTGGATTGTT-3'

図 2-3 Hin c II, Bam H I/Sma I および Eco R I/Cla I 断片の塩基配列

および酵母のアルギニン tRNA (73%, Gamulin ら 1983) とホモロジーが高いことが明らかになった (図 2-6)。

次に、PRE-1 配列のハプロイドゲノムあたりのコピー数の推定を行った。PRE-1 配列は、相対的に変異性の領域 (variable region) と保存性の領域 (conserved region) があることから (図 2-5), 1 種類の PRE-1 配列の全領域をプローブに用いてドットハイブリダイゼーションを行った場合、そのコピー数を過小評価する可能性がある。そこでコピー数を正確に推定するため、保存性の領域の DNA 配列 (図 2-5 の太下線) を持つオリゴヌクレオチドを合成し、それをドッ

Bam HI Sma I断片

1 5'-GGATCCAAGCCGCTCTGCAACCTACACCACAGCTCAGGCAACGCCGATTGTTAACCCACTGAGCAAG
 71 GGCAGGGACTGAACCCACAACCTCATGGTTCCTAGTCCGATTGTTAACCCACTGCGCCACGACGGAACT
 141 CCTGAAAAAATAATTTTATAATTAGCAATTTGAAGGCAATAAATAGTTTATGCCTAAAGTAATATAATG
 211 AAGGTTTATTGACTCCTTTTTTATTTTACACAATTTTCCCCACATAATTTTCACTCCTTTGTTGGCT
 281 CATCATTACTTAAATTTTAAATTTTAAATAAAATTATAGACCAGGAAAAACATTTAGGGCACAACATAAG
 351 GCTCAACATGGAACCTTGTGGAATACTTCATGACACAGTAGATTGAAGAGCTTTTAAAGATACCACCT
 421 CTTCTCTCTCTCACTTGGTGCACATATGCAGAGCTAGTAATTGTGAGTTCCGGCAAAACAGTGGCATTGAG
 491 TTCAGCTTTGTTCCATCTATAGTCTGTGACTCAAACTATTAGAGTAAGTTAAAAATTTAGTGTCTTT
 561 TGCCTAAAACCATATAATGAAATATTGCATTGCTTACAGTATATTGATTAGAGTGTTTGGGATAAAA
 631 AAAGTCATTCAACTAAATACACAGACGAAACCCAAAGGATTTGTTGTAAGCTAGTATAACTTTTTAA
 701 GAGCCACTGTAGTGGAAAGTTATCATCTAGGAGTCTCTTCCGGCCAGCTGGTTAAGGATCTGGCCTTA
 771 TCACTGCAGCAGCTTGGGTCACTGCTGCAGCTCAGATTGATTGCTGGCCCGGG-3'

Eco RI/Cla I断片

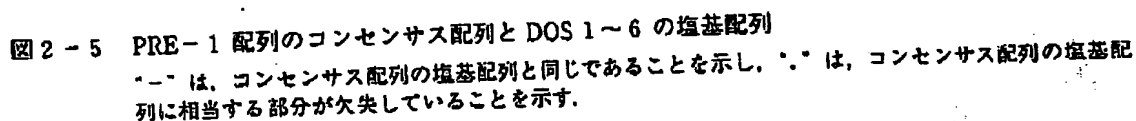
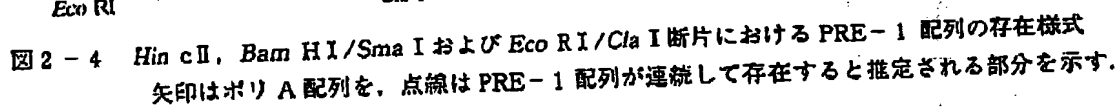
1 5'-GAATTCAGCTTCCTTTATCCGCTTCATATTTTAAGGATGATGTCATCTTTGCATATTTACCATTTGAAG
 71 GATAATTTTAAATGAAAAGTATACATTCTGTCTGCAGGGAAATCACTAGGATCCTCTTGACTTAAAAAGT
 141 TACCCTTGGAGTTCCTTTCATGGCTCAGTGCTTAATGAACCCGACTAGTATCCATGAGGATGTGGCTTCG
 211 ATCCCTCGTCTCACTCAGTGGGTTAAGGATCCAGTATTGCCGTGAACGTGTGCTGAGGTATAGATCGGG
 281 CTCGGTCTGGCATTGCTGGCAGCTACAGCTCTGATTCACTCTAGCTGGGAATCTTCATATGCCGCAAGTG
 351 TGGCCCTAAAAAGACCAAAATAGGAGTTCCTATCGTGGCAGAGTGGTTAACGAATCCAACCTAGGAACAC
 421 GAGATTGCCGATTGTTGCCCTGGCTTGCCTCAGTGGGTTAAGGATCCGGCGTTGCCGTGAGCTGTGGTAT
 491 AGGTCCGAGATGTGGCTTGGATCCCGGTTGCTGTGGCTTGGCTTACGCCAGTGGCTACGGTCCCATTA
 561 GACCCCTAGCCTGGGAACTCCATATGCCCTCGGAAGCAGCCCAAGAAATGGCAAAAAAAGAGACCAAA
 631 ATAAATAAATAAAGTGTACCCTCTCCCAATGTGTCAATTTACATGTAATGGCTAAACTTTTTTAATGA
 701 TAGACCTTTACAATCTTAAATCTTTATCGAT-3'

図 2-3

トハイブリダイゼーションのプロープに用いることによって、コピー数の推定を行った。その結果、PRE-1 配列のハプロイドゲノムあたりのコピー数は、ブタの各品種（メイション、ハンブシャー、ランドレース、大ヨークシャー、デュロック）とも、 10^4 コピーと推定された（図 2-7）。また、ヒト、マウスおよびウシにおいて、PRE-1 配列の陽性シグナルは認められなかった。

2.4 考 察

ブタのアルギニン tRNA の塩基配列情報がないので直接は比較できないが、ホモロジー解析の結果から、PRE-1 配列の起源がアルギニン tRNA であることが強く示唆された。これまで報告された哺乳動物の SINEs の多くが、tRNA に起源することが知られている。例えば、原猿類ガラゴの SINEs はメチオニン tRNA に（Daniels と Deiniger 1985）、ラットの identifier (ID) 配列はアラニン tRNA（Daniels と Deiniger 1985）またはフェニルアラニン tRNA に（Sakamoto と Okada 1985）、マウスの B 2 配列はセリン tRNA に（Daniels と Deiniger 1985）、それぞれ起源していると報告されている。SINEs は、DNA から RNA に転写された配列が逆転写酵素の働きで相補的な DNA になり、それがゲノム中に再び取り込まれて蓄積していったものと考えられているが（Jagadeeswaran ら 1981）、その生成過程は明らかではない。岡田（1994）は、哺乳動物以外の



ドットハイブリダイゼーションの結果から、PRE-1 配列はハプロイドゲノムあたり 10^6 コピー存在する、ブタ特異的な SINEs であることが示された。PRE-1 配列の長さを 230 bp、ブタのハ

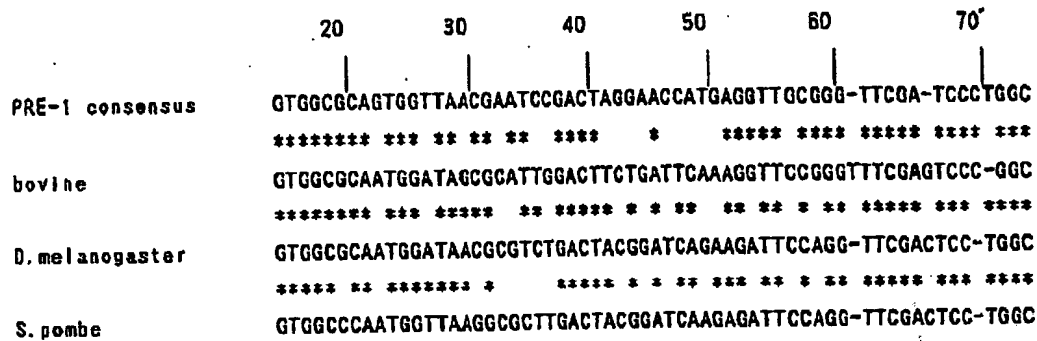


図2-6 PRE-1配列の15~74番目の塩基配列と、ウシ肝臓アルギニン tRNA、ショウジョウバエのアルギニン tRNA および酵母のアルギニン tRNA の塩基配列の比較

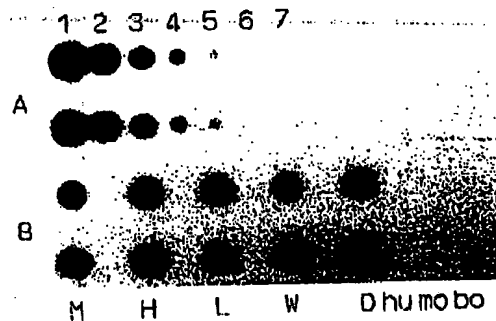


図2-7 ブタゲノム中のPRE-1配列のコピー数の推定

全てのDNAは、アルカリ処理後、ナイロンメンブレンにドットプロットした。パネルAには、ディプロイドゲノムあたりのコピー数のコントロールとして、PRE-1配列を3つ含む *Hin* c II断片を以下のコピー数相当ドットプロットした。(1)10¹コピー相当/ディプロイド、(2)3×10¹相当、(3)10²相当、(4)3×10²相当、(5)10³相当、(6)3×10³相当、(7)10⁴相当。パネルBには、以下のDNAを0.1μgずつドットプロットした。M: 梅山豚、H: ハンブシャー、L: ランドレース、W: 大ヨークシャー、D: デュロック、hu: ヒト、mo: マウス、bo: ウシ。ハイブリダイゼーションは、10 ng/ml の³²P標識プローブを含むハイブリダイゼーション液 (6×SSC、40%ホルムアミド、5×Denhart液、100 μg/ml 変性ニシン精子DNA、0.1% SDS) を用いて、42℃で一晩行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを2×SSC-0.1% SDSを用いて、室温で30分間、0.1×SSC-0.1% SDSを用いて、42℃で30分間洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

プロイドゲノムサイズを3×10⁸と仮定すると、PRE-1配列はブタゲノムの約7% ((230 bp×10⁴) / (3×10⁸) ×100%) を占めると計算された。

ヒトの *Alu* 配列は、長さ約300 bp、ハプロイドゲノムあたり0.27~1.0×10⁶コピー存在するSINEsである (Rinehartら 1981)。*Alu* 配列は、多型性に富んでおり、DNA多型マーカーとしてヒトの遺伝連鎖解析に応用されている (Iizukaら 1992)。PRE-1配列と *Alu* 配列の塩基配列には共通性が認められないが、ハプロイドゲノムあたりのコピー数や塩基配列のバリエーションが多い点など、その特性が類似している。このことからPRE-1配列は、ヒトにおける *Alu* 配列のように、ブタの遺伝連鎖マーカーとして有望である。そこで、第3章ではPRE-1配列の遺伝連鎖マーカーとしての有用性について検討する。

第3章 ブタ散在型反復配列 (PRE-1 配列) の遺伝連鎖マーカーとしての有用性の検討

3.1 緒言

ヒトにおいて、SINEs である Alu 配列の DNA 多型は、主に PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism, ポリメラーゼ連鎖反応—一本鎖高次構造多型) によって検出されている (Orita ら 1990; Iizuka ら 1992). PCR-SSCP 法の原理を模式的に図 3-1 に示した. PCR-SSCP 法では、最初に目的とする DNA 配列を PCR 法で増幅する. 増幅産物をホルムアミド存在下で熱変性して一本鎖 DNA とした後、DNA 塩基配列決定用の電気泳動装置を用いて、尿素のような DNA の変性剤を含まない非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う. 一本鎖 DNA は、泳動中にその DNA 配列に依存した高次構造をとりながら泳動される. したがって DNA の一部分に塩基配列の変異があると、その高次構造が変わるために電気泳動での移動度が変わる. この移動度の違いを利用した DNA 変異検出法が PCR-SSCP 法である.

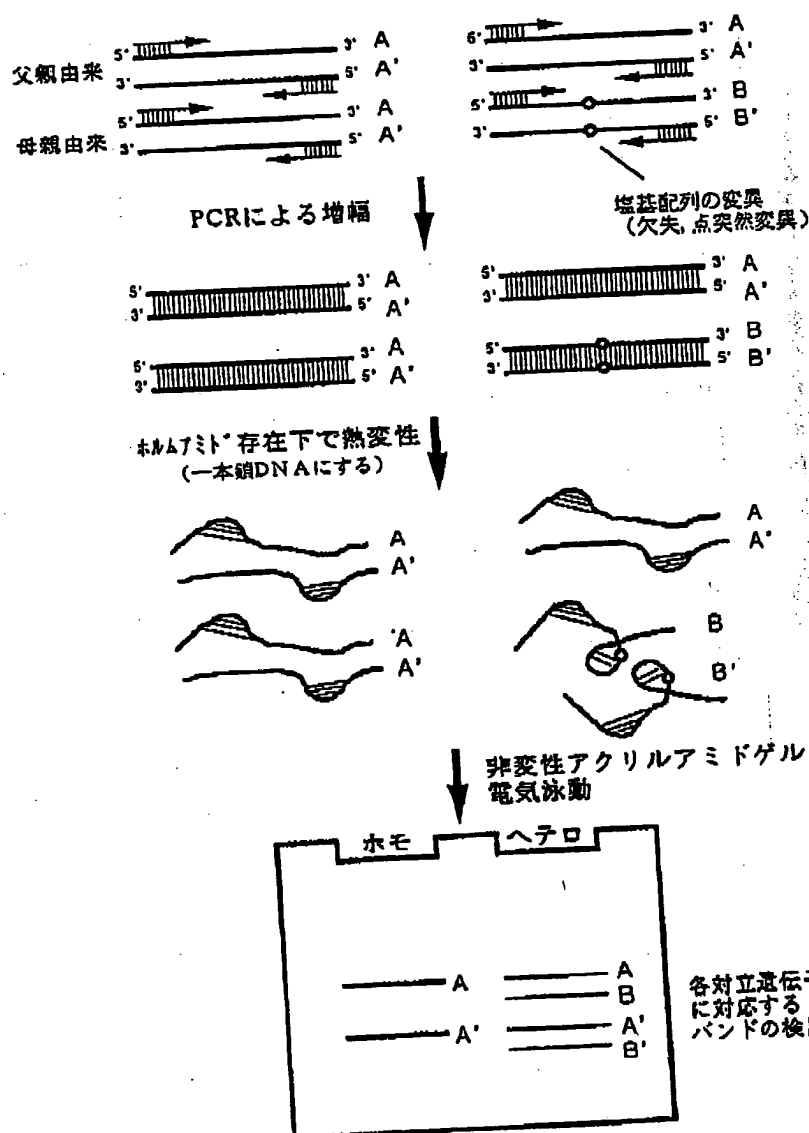


図 3-1 PCR-SSCP 法の原理

従来の PCR-SSCP 法では、PCR のプライマーをアイソトープ標識し、泳動後のゲルのオートラジオグラフィーを行うことによって、DNA 多型を検出していた (Orita ら 1990)。そのため、PCR-SSCP 法の実施にはアイソトープ実験施設が必要であり、被曝の危険も伴っていた。もしアイソトープを使用しない、簡易で安全な PCR-SSCP 法が確立されれば、その応用範囲は拡がると考えられる。

本研究では、ゲル中の一本鎖 DNA を直接可視化する高感度な銀染色法を開発し、非アイソトープの PCR-SSCP 法を可能にした。それをブタの PRE-1 配列に応用することによって、DNA 多型マーカーとしての有用性について検討した。

3.2 材料と方法

3.2.1 ブタゲノム DNA の調製

農林水産省畜産試験場で繁殖されている梅山豚、ハンプシャー、ランドレース、大ヨークシャー、デュロックの各品種雄 1 頭、およびランドレース雄 1 頭と梅山豚雌 1 頭、その交雑種の雌 5 頭から構成される家族の、合計 12 頭の血液から、フェノール-クロロホルム抽出法 (Sambrook ら 1989) を用いてゲノム DNA を調製した。

3.2.2 PCR 法による PRE-1 配列の増幅

PRE-1 配列内部の変異を検出するため、PRE-1 配列へ PCR-SSCP 法を応用した。まず DNA データベース (GenBank) に登録されているブタの全塩基配列と PRE-1 配列とのホモロジー検索を行った。その結果、PRE-1 配列は心臓カルパスタチン (GenBank の受理番号: M20160)、インヒビン β サブユニット (同: X03266 および X03267)、リラキシン (同: J02792)、MHC クラス I PD 6-グリコプロテイン (同: M17014)、アポリポプロテイン B (同: M22646 および M22627)、TGF β (同: M23703) の各遺伝子座に存在することがわかった。そこで、このほかに本研究で単離した PRE-1 配列 (DOS 2, DOS 5 および DOS 6) を加えて、9 個の PRE-1 配列について PCR-SSCP 法による多型検出を試みた。

各 PRE-1 配列を増幅する PCR のプライマー (オリゴヌクレオチド) を設計し、それを用いて各 PRE-1 配列を PCR 法によって増幅した (表 3-1)。PCR 反応液の組成を表 3-2 に示した。

表 3-1 PRE-1 配列増幅用の PCR のプライマー

部位	塩基配列	アニーリング温度
1. DOS 2	5'-CCACATGCTT CCCTTCATAA GCAAAGTTGG-3'	60℃
	5'-CTCTCTGTGA ATCTTGGGTC ATGTTTTTCC-3'	
2. DOS 5	5'-GGAAATCACT AGGATCCTCT-3'	50℃
	5'-CTCCTATTTT GGTCTTTTTA-3'	
3. DOS 6	5'-CTAAAAAGAC CAAAAATAGGA-3'	50℃
	5'-TGTAATTTGA CACATTTGGG-3'	
4. heart calpastatin	5'-AAAATTCTCT TTAATAATCA TGTGTTTGGA-3'	55℃
	5'-GAAATCCCAT TGGTATAACA CATGA-3'	
5. inhibin β subunit	5'-AGCCAGACAG TGA CTCTAGA AGA-3'	60℃
	5'-TCTGGCCTGC GACTGTCAAG A-3'	
6. relaxin	5'-GCATTTTTC A GAATTGTCA-3'	50℃
	5'-CGCAACTCCA AGCAAAGTGA-3'	
7. MHC class I PD 6-glycoprotein	5'-TTTGTTCTCA GAAACCGAG AACAG-3'	64℃
	5'-AAGGTCTACA GAAGGACTCC TGCTC-3'	
8. apolipoprotein B	5'-AATATCATGC ACTTGAGTAT GGAAC-3'	64℃
	5'-AGACATGCAG ATAAAAGTTT CAGAG-3'	
9. TGF β (transforming growth factor β)	5'-GACTCTGATA ACACCCACTT TAA-3'	55℃
	5'-GAATTATTCC CTTAACCACT ATG-3'	

表3-2 PCR 反応液組成

ブクゲノム DNA	50 ng	
プライマー	各プライマー 25 pmoles	
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ミックス	各 dNTP 200 μ M	
Tris-HCl (pH 8.9)	10 mM	
KCl	80 mM	*
MgCl ₂	1.5 mM	
ウシ血清アルブミン (BSA)	500 μ g/ml	
コール酸ナトリウム	0.1%	
Triton X-100	0.1%	
Tth DNA ポリメラーゼ (東洋紡)	1 unit	

*50 μ l/チューブ

PCR 反応は 93℃, 4 分間熱変性後, 熱変性 (93℃, 1 分), アニーリング (2 分), 伸長反応 (72℃, 2 分) を 30 サイクル行った。各 PRE-1 配列のアニーリング温度は, 表 3-1 に示す温度に設定した。

3.2.3 電気泳動

PCR 反応液 1 μ l を, 変性液 (0.01% キシレンシアノール, 0.01% プロモフェノールブルー, 0.05×TBE (1×TBE は 50 mM Tris, 48.5 mM ホウ酸, 1 mM EDTA), 50% ホルムアミド) と混合して, 50~100 倍希釈した。希釈したサンプルを 85℃, 5 分間熱変性した後, 直ちに氷冷した。このうちの 1 μ l を電気泳動に供した。

電気泳動は, Orita ら (1990) の方法に準じて行った。すなわち, 0.5×TBE, 10% グリセリン, 6% ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=49:1) を作製し, ミニスラブゲル電気泳動装置 (マリソル KS-8012 型, ゲルサイズ: 85×75×1 mm, コウム幅 6 mm) を用いて, 50 ボルト定電圧, 20℃ で 4 時間電気泳動を行った。

3.2.4 銀染色

電気泳動後のゲルを, 表 3-3 に示す手順で銀染色した。各ステップは, 室温下で, 穏やかに振盪しながら行った。染色後のゲルを, ライトボックスのスリガラス上に乗せ, 透過光下で写真撮影した。

3.3 結果

3.3.1 銀染色の検出感度

今回用いた銀染色の検出感度を確認する目的で, 常法 (Sambrook ら 1989) にしたがって, ϕ X 174 ファージの二本鎖 DNA を制限酵素 *Hin* cII で消化したサンプル (以下, ϕ X 174/*Hin* cII, ニッポンジーン) を, 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動し, 銀染色した。図 3-2 に, ϕ X 174/*Hin* cII を各レーンに 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 ng を電気泳動した結果を示した。各バンドの DNA 量は, ϕ X 174 ファージ DNA を *Hin* cII で消化したとき生ずる各 DNA 断片のサイズと ϕ X 174 ファージ DNA のサイズの比に, 電気泳動した総 DNA 量を掛けることによって求めた。例えば, 0.1 ng のレーンに注目すると, 各バンドは括弧内の DNA 量に相当すると計算された: 1057 bp (19.6 pg), 770 bp (14.3 pg), 612 bp (11.4 pg), 495 bp (9.2 pg), 392 bp (7.3 pg), 345+341 bp (12.7 pg), 335 bp (6.2 pg), 297+291 bp (10.9 pg), 210 bp (3.9 pg), 162 bp (3.0 pg), 79 bp (1.5 pg)。このレーンでは, 1057 bp から 210 bp までのバンドが確認できた (図 3-2)。したがってこの方法の検出感度は, 約 6 mm² のバンド当たり 3.9 pg (0.65 pg/mm²) であった。

3.3.2 PRE-1 配列の PCR-SSCP 解析

5 品種 (梅山豚, ハンプシャー, ランドレース, 大ヨークシャーおよびデュロック) の雄, 各 1 頭のゲノム DNA を鋳型として, 9 座位の PRE-1 配列を PCR 法によって増幅し, SSCP 法によ

表3-3 銀染色法の手順

ステップ	溶液	時間
1	50% エチルアルコール	45 分
2	蒸留水	5 分 × 3 回
3	アルカリ溶液 (0.075% 水酸化ナトリウム)	30 分
4	銀染色液 (0.075% 水酸化ナトリウム, 0.25% アンモニア水, 20 mM 硝酸銀)	15 分
5	蒸留水	5 分 × 3 回
6	現像液 (0.005% クエン酸, 0.0185% ホルムアルデヒド)	5 分
7	蒸留水	1 分
8	アルカリ溶液 (0.075% 水酸化ナトリウム)	5 分
9	蒸留水	10 分以上

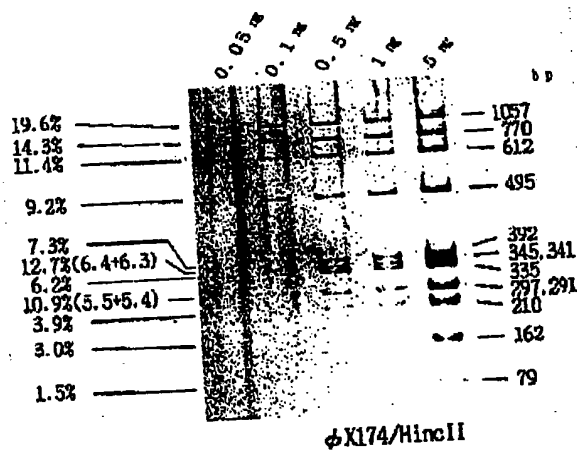


図3-2 銀染色の検出感度

写真の右側に、 ϕ X174/*Hinc*II の各バンドの DNA サイズ (bp) を示した。また、 ϕ X174/*Hinc*II の各バンドが、ポリアクリルアミドゲルに乗せた DNA 量の何パーセントに相当するか、左側に示した。例えば、0.1 ng のレーンの 1057 bp のバンドには、0.1 ng の DNA の 19.6% 相当が存在するので、19.6 pg (0.1 ng (100 pg) \times 0.196) の DNA が存在すると計算される。

る多型検出を行った。その結果、PRE-1 配列の各対立遺伝子に対応すると思われるバンドが検出された (図3-3)。すなわち、バンドが2本検出された個体はホモ、バンドが4本検出された個体はヘテロ接合体を形成していると推測された。バンドが3本検出された個体はバンドの濃淡から、1 配列のうち6座位 (DOS2, 心臓カルバスタチン, インヒビン β サブユニット, リラキシン, MHCクラスI PD6-グリコプロテインおよびTGF β) において、何らかの多型が検出された。同様に、ブタの親子 (ランドレース \times 梅山豚 \times 5頭のF1 \times 計7頭) のゲノムDNAを鋳

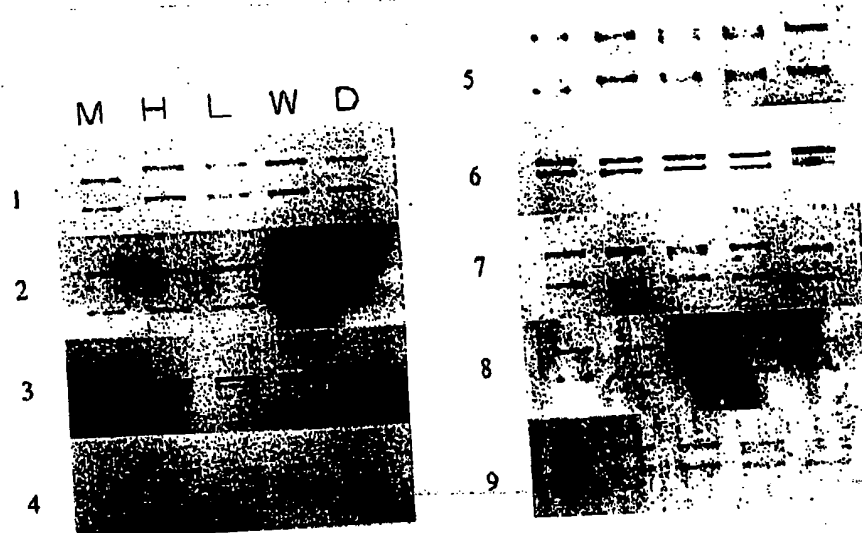


図3-3 PRE-1 配列のPCR-SSCP多型
M: 梅山豚, H: ハンプシャー, L: ランドレース, W: 大ヨークシャー, D: デュロックを示す。番号1~9は、表3-1に示すPRE-1配列に対応する。

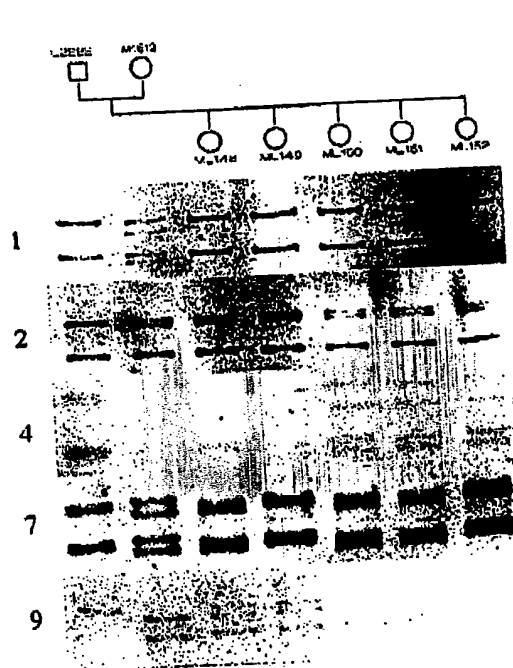


図3-4 親子関係にあるブタのPCR-SSCP解析

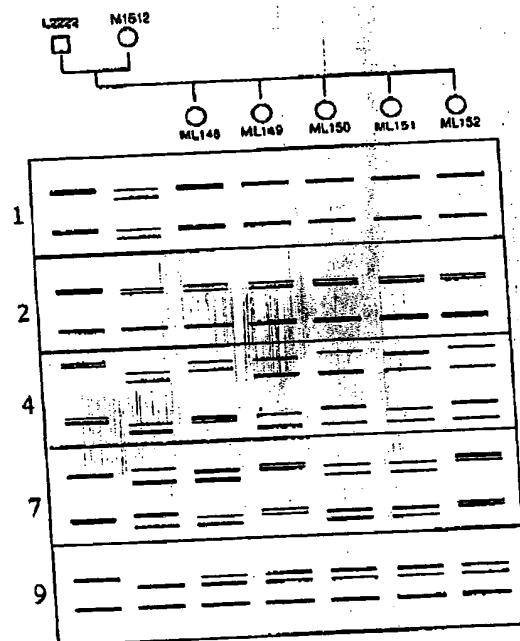


図3-5 図3-4のSSCP解析の結果の模式図
1: DOS2, 2: DOS5, 4: 心臓カルバスタチン,
7: MHCクラスI PD-6グリコプロテイン,
9: TGF β

型として、PCR-SSCP法によるPRE-1配列の解析を行った(図3-4および-5)。両親のDNAを解析したところ、9座位のPRE-1配列のうち5座位(DOS2, DOS5, 心臓カルバスタチン, MHCクラスI PD-6グリコプロテインおよびTGF β)において多型が検出された。DOS2(図3-4および-5, 1)において、父親はホモ接合体、母親は4本(DOS2)のバン

ドを示すヘテロ接合体であったが、母親の対立遺伝子対の一方のみが子に伝わったバンドパターンを示した。同様に、DOS 5 (図3-4および-5, 2) において、父親はホモ接合体、母親は3本 (DOS 5) のバンドを示すヘテロ接合体であり、母親の対立遺伝子対の一方のみが子に伝わったバンドパターンを示した。心臓カルバスタチンおよびMHCクラスI PD 6-グリコプロテイン遺伝子に存在するPRE-1配列 (図3-4および-5, 4および7) では、両親のもつ各対立遺伝子対のバンドは、子供にほぼ均等に分配されて伝わったパターンを示した。TGF β 遺伝子に存在するPRE-1配列 (図3-4および-5, 9) では、両親ともホモ接合体のバンドパターンであり、子どもは両親の各対立遺伝子対を受け継いだヘテロ接合体のバンドパターンを示した。

図3-3と図3-4の泳動結果をまとめると、調査した12頭のブタでは、9座位のPRE-1配列のうち合計7座位 (DOS 2, DOS 5, 心臓カルバスタチン, インヒビン β サブユニット, リラキシン, MHCクラスI PD 6-グリコプロテインおよびTGF β) において何らかの多型が検出された。図3-3と図3-4の梅山豚のレーンを比較すると、DOS 2とDOS 5でバンドパターンが異なっており、個体変異と思われた。

3.4 考 察

Switzerら (1979) によって報告された蛋白質のポリアクリルアミドゲル電気泳動像の銀染色法は、その後改良が加えられ (Oakleyら 1980), 核酸の検出にも応用されるようになった (SomervilleとWang 1981; Beidlerら 1982)。現在広く用いられている銀染色法として、Oakleyら (1980) の方法がある。その手順および原理は、次のように要約される (図3-6-A)。①電気泳動後のポリアクリルアミドゲルを銀染色液に浸す。この時、核酸のアミド基 ($-\text{NH}_2$) に、銀染色液中のアンモニア銀の錯体 ($[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$) が反応して結合する。そこで $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ と酸化銀 (Ag_2O) が平衡状態をとる。②十分に蒸留水で洗浄し、核酸に結合しなかった $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ をゲルから除く。③現像液に浸して染色像を得る。この時、現像液のホルムアルデヒド・クエン酸によって、 Ag_2O が還元され、金属銀 (Ag) になる。

本研究の銀染色法は、Oakleyら (1980) の方法に、ゲルを短時間洗うステップと、アルカリ液に再び浸すステップを加えたものである (表3-3)。これによって、検出感度が大きく向上した。増感のメカニズムは、次のように推察される (図3-6-B)。①現像液に浸したゲルを短時間洗

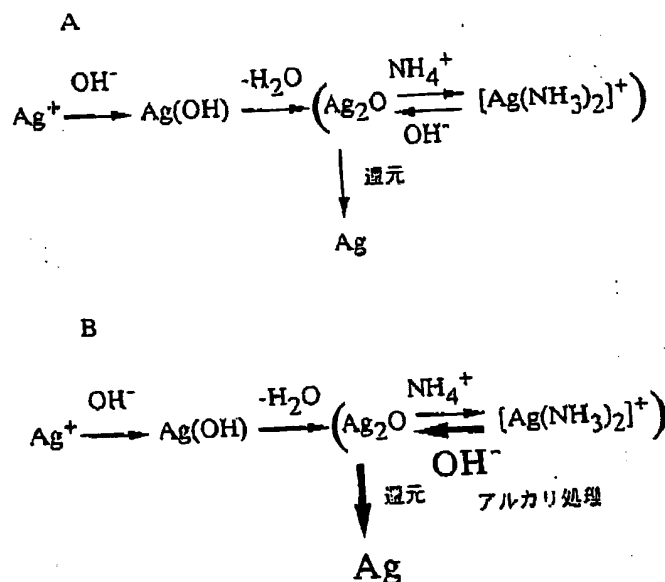


図3-6 銀染色法の原理

→ は、アルカリ処理によって、反応が促進されたことを示す。

浄するが、この時間では現像液はゲルから抜けきらない、②この状態で、ゲルをアルカリ液に浸すと、核酸の $-NH_2$ に結合していた $[Ag(NH_3)_2]^+$ が、過剰の水酸基 (OH^-) によって、 Ag_2O に変わる。これが、ゲルに残っている現像液によって速やかに還元されて Ag となるため、感度が向上する。本研究の銀染色法（検出感度 0.65 pg/mm^2 ）は、Beidlerら（1982）の方法（ $5\sim 7.5\text{ pg/mm}^2$ ）の約10倍、Bassamら（1991）の方法（ 1.5 pg/mm^2 ）の約2.3倍高感度であり、これをPCR-SSCP法に応用することによって非アイソトープのPCR-SSCP法が確立された。

PCR-SSCP法は、DNA配列の点変異をも検出できる多型検出法であるが、全てのDNA変異を検出できるわけではない（HayashiとYandell 1993）。確かにPCR-SSCP法で全てのDNA変異を検出できるのであれば、PRE-1配列のヘテロ接合体は4本のバンドとして検出されるはずである。しかしながら、3本のバンドとして検出されたものもあった。幸いなことに3本のバンドのうちの1本は、他の2本より明らかに濃いバンドであり、2本の対立遺伝子バンドが重なっているヘテロ接合体であると推測されたが、このことは、PRE-1配列のDNA変異をPCR-SSCP法では完全には検出できないことを示唆している。また、バンドが2本検出され、ホモ接合体と判断された個体であっても、本当はヘテロ接合体である可能性を否定できない。しかしながら、PCR-SSCP法は、制限酵素切断部位の塩基配列の変異しか検出できないRFLPs（restriction fragment length polymorphisms, 制限断片長多型）法に比べて、DNA多型検出法としてはるかに優れている。したがって、特定座位のPRE-1配列の多型の有無を確認する方法として、PCR-SSCP法は十分活用できると思われた。

ブタの親子を材料に用いたPCR-SSCP解析の結果から、PRE-1配列の各対立遺伝子対に対応するバンドパターンの遺伝様式を検討することによって、PRE-1配列をマーカーに用いた遺伝連鎖解析が可能であることが示された。DOS 2およびDOS 5では、母親の対立遺伝子対のどちらか一方のみが子に伝わったバンドパターンを示した（図3-4）が、この2つは、同じDNA断片（第2章のラムダファージクローンB）に由来するPRE-1配列であるので、同様の遺伝様式を示したと推察された。またこの偏った遺伝様式がメンデル遺伝しているかどうかは、調査したF1の個体数が少ないので明らかにできなかった。

本研究によって、簡易で安全なPCR-SSCP法が確立された。また、PRE-1配列をマーカーに用いた遺伝連鎖解析が可能であることが示され、PRE-1配列を用いたブタの遺伝連鎖地図への道が開けた。

第4章 ニワトリのマイクロサテライトDNAの効率的単離法の開発

4.1 緒言

マイクロサテライトDNAは、2～数ヌクレオチドから構成される単純繰り返し配列である。代表的なマイクロサテライトDNAとしては、(CA) $_n$ リピートがある。

最近、マイクロサテライトDNAをマーカーに用いた遺伝連鎖解析が、哺乳動物において盛んに行われているが、ニワトリでは既知のマイクロサテライトDNAマーカーの数が少なく、それを用いた遺伝連鎖解析の報告も少ない（Chengら 1995）。また、ニワトリのマイクロサテライトDNAのハプロイドゲノムあたりのコピー数は少ないため、哺乳動物を材料として開発されたマイクロサテライトDNAの効率的な単離法（Ostranderら 1992）をニワトリへ応用しても、マイクロサテライトDNA単離の効率は低い（ChengとCrittenden 1994）。そこで本研究では、ニワトリのマイクロサテライトDNAの効率的な単離法の開発を行った。

4.2 材料と方法

4.2.1 ニワトリゲノムDNAの調製

ゲノムDNAは、雌の白色レグホン1羽の血液から、フェノール-クロロホルム抽出法を用いて調製した（Sambrookら 1989）。

4.2.2 ニワトリゲノム DNA のプラスミドベクターへの連結

ニワトリゲノム DNA 50 μ g を、平滑末端を生ずる3つの制限酵素 (Dra I, Eco RV および Hae III) で切断後、1.5% アガロースゲル電気泳動を行った。常法 (Sambrook ら 1989) にしたがって、300~500 bp の DNA 断片を含むゲルを切り出し、透析チューブに入れて電気溶出 (electroelution) した。透析チューブから DNA 溶液を回収し、フェノール抽出、エタノール沈殿を行った後、沈殿を 200 μ l の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液に溶解した。これに 5 μ l (2 ユニット) の細菌由来アルカリホスファターゼ (bacterial alkaline phosphatase, 東洋紡) を加えて、50℃ で一晩反応させてゲノム DNA を脱リン酸化した。フェノール抽出を行って酵素を失活させた後、エタノール沈殿を行った。沈殿を 20 μ l の滅菌蒸留水に溶解し、OD₂₆₀ の値から DNA 濃度を推定した後、最終濃度を 200 ng/ μ l に調整した。pCR-Script SK(+) クローニングキット (#211190, Stratagene) のマニュアルにしたがって、Srf I で切断された 1 μ l (10 ng) の pCR-Script SK(+) ベクター、5 μ l (1 μ g) のゲノム DNA、0.5 μ l の 10 mM ATP、1 μ l の 10× 反応バッファー、1 μ l の T4 DNA リガーゼ、1 μ l の Srf I および 0.5 μ l の滅菌蒸留水を混合し、24℃ で一晩ライゲーション反応を行った。ゲノム DNA と滅菌蒸留水以外は、キットに含まれているものを使用した。

4.2.3 一本鎖 DNA の調製

ライゲーション反応液 10 μ l を、大腸菌 XL 1-Blue MRF' のコンピテント細胞 (Epicurian Coli supercompetent cells, Stratagene) 200 μ l に加えて、30 分間氷中に静置することによって形質転換した。ヒートショック (42℃, 45 秒) 後、あらかじめ 42℃ に温めておいた 800 μ l の SOC 培地 (2% バクトトリプトン、0.5% イーストエキストラクト、0.0585% NaCl, 0.0186% KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM グルコース, pH 7.0) を加えて、37℃ で 1 時間振盪培養を行った。これに、10⁶ pfu 相当のヘルパーファージ VCSM 13 を感染させ、アンピシリンとカナマイシリンを最終濃度 50 μ g/ml と 75 μ g/ml になるように加えて、37℃ で 20 分間振盪培養を行った。この全量をさらに、アンピシリン (50 μ g/ml) とカナマイシン (75 μ g/ml) を含む 100 ml の 2×YT 培地 (1.6% バクトトリプトン、1% イーストエキストラクト、1% NaCl, pH 7.2) に接種して、37℃ で一晩振盪培養を行った。

培養上清を遠心分離によって回収した後、常法 (Sambrook ら 1989) にしたがって、組み換えファージを PEG/NaCl 溶液を用いて沈殿させた。沈殿を 500 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 溶液に溶解した後、再び PEG/NaCl 溶液を用いてファージを沈殿させた。沈殿を 500 μ l の DNase I バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM MnCl₂) に溶解した後、0.035 ユニットの DNase I (宝酒造) と 5 μ g の RNase A (半井化学) を加えて、20℃ で 20 分間インキュベートし、再度 PEG/NaCl 溶液を用いてファージを沈殿させた。沈殿を 500 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 溶液に溶解した後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行った。沈殿を 50 μ l の TE バッファーに溶解し、OD₂₆₀ の値から一本鎖 DNA (以下、ssDNA) の濃度を推定した後、最終濃度 1 μ g/ μ l に調整した。

4.2.4 (CA)_n リピートを含むクロンの選別

(CA)_n リピートを含むクロンを *in vitro* で選別することを目的として、Ostrander ら (1992) の方法に準じて、プライマー伸長反応を行った。まず、プライマーとなる (CA)₁₀ オリゴヌクレオチドの 5' 末端をリン酸化した。2 μ l (100 pmol) の (CA)₁₀ オリゴヌクレオチド、1 μ l の 10× Protruding end kinase バッファー (東洋紡)、1 μ l の 10 mM ATP、5 μ l の滅菌蒸留水および 1 μ l (10 ユニット) の T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (東洋紡) を混合し、37℃ で 1 時間インキュベートした。その後、反応液を 70℃ で 10 分間インキュベートすることによって酵素を失活させた。そのまま反応液を 70℃ に保ち、3 μ l (3 μ g) の ssDNA、10 μ l の 10× pfu ポリメラーゼバッファー (Stratagene)、1 μ l の dNTP ミックス (各 20 mM)、74 μ l の滅菌蒸留水を加えて、さらに 70℃、10 分間インキュベートした。これによって、(CA)_n オリゴヌクレオチドを、その相補鎖 ((GT)_n リピート) を有する ssDNA とアニールさせた (図 4-1, I)。その後 2 μ l (5 ユニット)

の pfu ポリメラーゼ (Stratagene) を混合し、70℃ で 30 分間インキュベートしてプライマー伸長反応を行った (図 4-1, II)。フェノール抽出によって酵素を失活させて、エタノール沈澱を行った後、沈澱を 10 μl の TE バッファーに溶解した。

この溶液に、2 μl の 10×T 4 DNA リガーゼバッファー (ニッポンジーン)、1 μl の 10 mM ATP、6 μl の滅菌蒸留水および 1 μl (5 ユニット) の T 4 DNA リガーゼ (ニッポンジーン) を混合し、37℃ で 1 時間インキュベートした。この反応によって、プライマー伸長反応の結果できた二本鎖 DNA を閉環させた (図 4-1, III)。65℃、15 分間インキュベートして T 4 DNA リガーゼを失活させた後、10 μl の 10×Mung bean スクレアーゼバッファー (東洋紡) と 1 μl (50 ユニット) の Mung bean スクレアーゼ (東洋紡) を加えて、37℃ で一晩インキュベートした。これによって、プライマー伸長反応が起きなかった ssDNA を消化した (図 4-1, IV)。フェノール抽出を行って酵素を失活させて、エタノール沈澱を行った後、沈澱を 60 μl の TE バッファーに溶解した。このうちの 2 μl (ssDNA 100 ng 相当) を、大腸菌 XL 1-Blue MRF' のコンピテン ト細胞に形質転換し、アンピシリン (50 μg/ml) とカナマイシン (75 μg/ml) を含む 2×YT 寒天培地に展開した。その結果、約 5000 個のコロニー (1 μg の ssDNA あたり、4 × 10⁴ コロニー) を得た。これを、(CA)_n 濃縮ライブラリー ((CA)_n-enriched library) と呼ぶことにする。

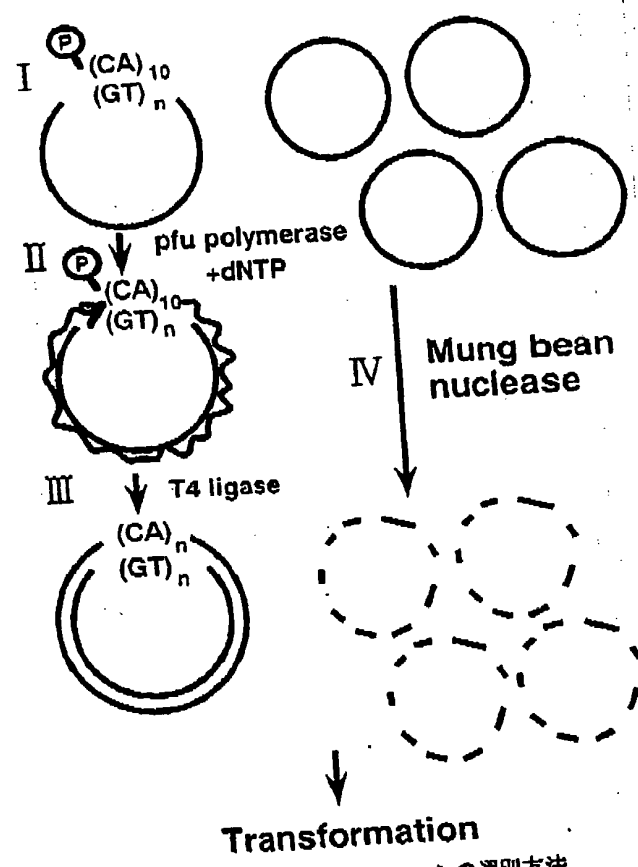


図 4-1 (CA)_n リピートを含むクローンの選別方法
 I: (CA)_n オリゴヌクレオチドのアニーリング
 II: pfu ポリメラーゼによるプライマー伸長反応
 III: T 4 リガーゼによる閉環
 IV: Mung bean スクレアーゼによる一本鎖 DNA の消化

4.2.5 (CA)。濃縮ライブラリーのスクリーニング

(CA)。濃縮ライブラリーから無作為にコロニーを拾い上げ、2 mlの2×YT培地に接種して、37℃で一晩振盪培養した。遠心分離によって集菌し、アルカリ-SDS法を用いてプラスミドDNAを抽出した。菌体を100 µlの溶液I (50 mM グルコース, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0) に懸濁後、200 µlの溶液II (0.2 N NaOH, 1% SDS) を加えて転倒混和、ついで150 µlの溶液III (3 M 酢酸カリウム, 11.5% 氷酢酸) を加えて転倒混和した後、水中に10分間静置した。14,000 rpm, 4℃で10分間遠心して、上清を回収した。これを2回フェノール抽出後、2倍量の99.5% エタノールを加えてエタノール沈殿を行った。沈殿を50 µlのRNase A (5 µg/ml) を含むTEバッファーに溶解し、37℃で30分間インキュベートした。これに、30 µlのPEG/NaCl溶液を加えて混和し、水中で1時間静置することによって、プラスミドDNAを沈殿させた。14,000 rpm, 4℃で10分間遠心してプラスミドDNAを回収し、沈殿を70% エタノールで2回洗浄した後、50 µlのTEバッファーに溶解した。OD₂₆₀の値から各プラスミドDNAの濃度を推定した。10 ng相当の各プラスミドDNA溶液に、NaOHを終濃度0.5 Mになるように加えて、室温で10分静置した後、ナイロンメンブレン (#1209299, ベーリンガー・マンハイム) にドットプロットした。そしてメンブレンを、ドットハイブリダイゼーションによってスクリーニングした(図4-2)。

4.2.6 DNA塩基配列の決定

(CA)。陽性クローン塩基配列は、オートサイクルシーケンシングキット (ファルマシア) のマニュアルにしたがってサンプル調整後、自動DNAシーケンサー (ALF-II, ファルマシア) を用いて決定した。

4.3 結果

(CA)₁₀ オリゴヌクレオチドをプローブに用いたドットハイブリダイゼーションによるスクリーニングにおいて、(CA)。濃縮ライブラリーの約70%のクローンが陽性を示した(図4-2)。(CA)。陽性クローンの65個をランダムに選択し、その塩基配列を決定したところ、陽性クローンは全て(CA)。リピートを含んでいた。CAのリピート回数は6回から28回であり、インサートサイズは300~500 bpであった。65クローンのうち32クローン(49.2%)はユニークであり、33クローンは他のクローンと重複していた。32個のユニーククローンの平均CAリピート回数は13.1回であった(表4-1)。このうち29クローンにおいて、(CA)。リピート多型検出のためのPCRプライマーの設計が可能であった。残りの3クローンでは、インサート中の(CA)。リピートがベクターのクローニングサイトに近接しているために、PCRプライマーの設計ができなかった。

4.4 考察

マイクロサテライトDNAを濃縮(enrichment)する方法について、これまでいくつかの報告がある(Ostranderら 1992; Karagoyozovら 1993; Kandpalら 1994)。このうち、Ostranderら(1992)の方法は、最も効率的な方法の一つである。しかし、この方法のニワトリへの応用は、効率的とはいえない結果であった(ChengとCrittenden 1994)。これは、ニワトリのマイクロサテライトDNAのコピー数が少ないことに起因すると思われる。Crooijmansら(1993)は、ニワトリのマイクロサテライトDNAのハプロイドゲノムあたりのコピー数を、7,500コピーと推定しており、この数字は、哺乳動物のコピー数の10分の1以下である。本研究では、Ostranderら(1992)の方法(以下、原法)を改変することによって、ニワトリのマイクロサテライトDNA単離の効率化を図った。主な改良点は次の4点に集約される:

1) クローニングベクターの変更

原法では、プラスミドベクターpBluescript KS (+) (Stratagene) を用いて、制限酵素で消化したゲノムDNAを、ベクターのSma I部位に連結している。この過程における問題点は次の2つである:

①原法は、連結反応に用いるゲノムDNAを脱リン酸化していない。連結反応中に、ゲノムDNA

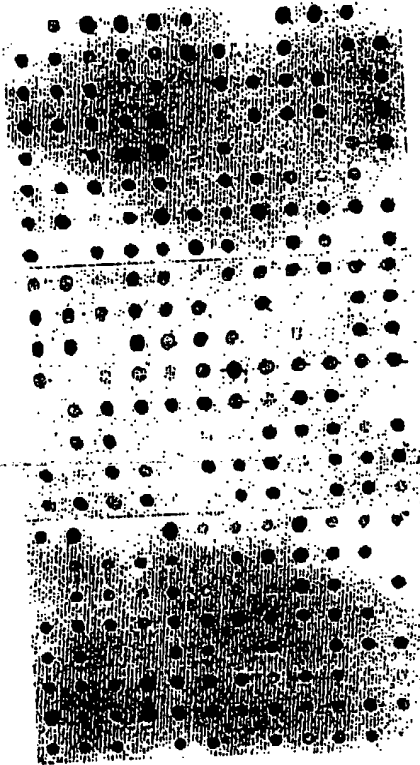


図4-2 (CA)。濃縮ライブラリーのドットハイブリダイゼーションによるスクリーニング

ドットハイブリダイゼーションに用いる(CA)オリゴヌクレオチドプローブの3'末端を、キット(#1362372, ベーリンガー・マンハイム)を用いてジゴキシゲニン標識した。ハイブリダイゼーションは、キットのマニュアルにしたがって、50℃、16時間行ったメンブレンを2×SSC-0.1% SDSを用いて、室温で30分間、0.1×SSC-0.1% SDSを用いて、50℃で30分間洗浄した。陽性クローンの検出には、ジゴキシゲニン検出キット(#1175041, ベーリンガー・マンハイム)を用いた。

は互い連結することができ、人工的な断片を生ずる。これがベクターに連結すれば、人工的な断片を含んだ不完全なゲノムライブラリーになってしまう。

②大部分のベクターDNAが、連結反応中に自己連結(self-ligation)してしまう。原法では、自己連結したベクターを除く目的で、連結反応液をSma Iで消化してから大腸菌に形質転換を行っている。形質転換効率が低くなってしまう。

そこで、これらの問題点を解決する改良を行った：

a) 連結反応に用いるゲノムDNAを脱リン酸化することによって、人工的な断片の生成を防止した。本研究では300~500 bpの大きさのゲノムDNA断片を連結反応に用いたので、もし断片の数が連結した人工的な断片がベクターに連結すれば、600 bp以上の挿入断片を持つクローンが出現するはずである。しかし本研究のクローンは全て、300~500 bpの挿入断片であり、人工的な断片は生じていないことが確認された。

b) pBluescript KS (+)の代わりに、pCR-Script SK (+) (Stratagene)を使用した。pCR-Script SK (+)のクローニング系では、脱リン酸化したゲノムDNA、あらかじめ制限酵素Srf Iで切断したpCR-Script SK (+)ベクター、T4 DNAリガーゼおよびSrf Iを混合して連結反応を行う(図4-3)。連結反応液中のSrf Iの存在は、切断された状態のpCR-Script SK (+)ベクターを維持し、ゲノムDNAがベクターに連結しやすい平衡状態を作り出す(図4-3)。そのため、結果的にゲノムDNAを組み込んだpCR-Script SK (+)ベクターの割合が増加する(図4-3)。これによって、形質転換効率は大きく向上した。

表1-1 (CA)_n 濃縮ライブラリーから単離したユニーククローンの特徴

Clone	Length of repeat	Primer design
		Yes
1	(CA) ₁₀	Yes
2	(CA) ₁₃	Yes
3	CA ₁ (CA) ₁₃	Yes
4	(CA) ₁₀	Yes
5	(CA) ₁₅ C	Yes
6	(CA) ₁ C	Yes
7	(CA) ₂₀	Yes
8	(CA) ₁ G(CA) ₁₄	Yes
9	(CA) ₁ TA(CA) ₄ C	Yes
10	(CA) ₁	Yes
11	A(CA) ₁₁ C	Yes
12	(CA) ₁₂	Yes
13	(CA) ₁	Yes
14	A(CA) ₁₁ C ₂ A ₂₀	Yes
15	A(CA) ₂₀	Yes
16	A(CA) ₁₂	Yes
17	(CA) ₁₇ A ₂ (CA) ₂	Yes
18	(CA) ₂₂ C	Yes
19	CA ₁ (CA) ₃ C	Yes
20	AC ₂ (CA) ₁₀	Yes
21	(CACT) ₂ (CA) ₁₀	Yes
22	A(CA) ₁ A ₁	Yes
23	(CA) ₁₁ A ₁	Yes
24	(CAC) ₂ G(CA) ₄	Yes
25	(CA) ₁₀ G ₂ (CA) ₃	No
26	A(CA) ₁ C(CA) ₁₀ A	Yes
27	CA ₂ CATA(CA) ₁₁	Yes
28	A(CA) ₂₀ C	No
29	(CA) ₁₀ C ₂ (CA) ₃	Yes
30	(CA) ₁₁	No
31	(CA) ₁₂ A ₁	Yes
32	(CT) ₁ (CA) ₁ GA(CA) ₄ C	
Mean continuous repeat length		13.1

2) コンピテントセルの変更

原法は、大腸菌 CJ 236 を使用して ssDNA を調製しているが、本研究では、高い形質転換効率を得るため CJ 236 の代わりに XL 1-Blue MRF' を用いた。用いたコンピテントセル (XL 1-Blue MRF', Epicurian Coli supercompetent cells, Stratagene) の保証書に基づいて試算すると、本研究では ssDNA を 1×10^7 個のクローン (1×10^8 の形質転換体/ $\mu\text{g} \times 10 \text{ ng}$ の pCR-Script SK (+) ベクター) から調製したことになる。この数字は原法の約 200 倍であり、より多くのクローンから (CA)_n リピートを含むクローンを選別できるようになった。

3) DNase I と RNase A の使用

本研究では、ssDNA を DNase I と RNase A を用いて注意深く調製した。Ostrander ら (1992)

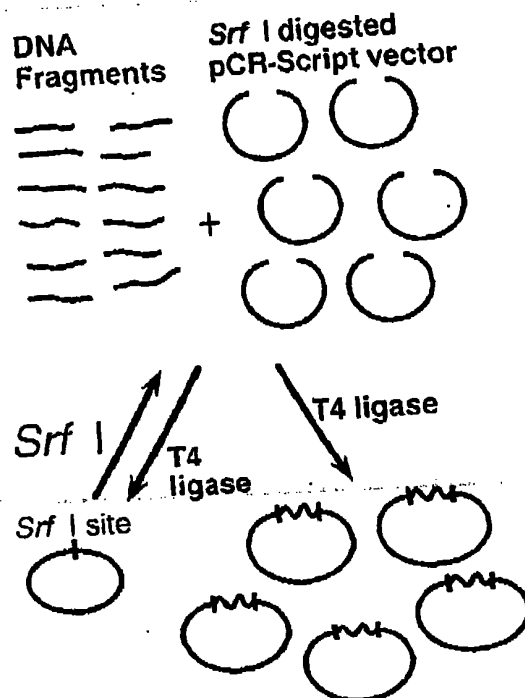


図4-3 pCR-Script SK (+) クローニング系の原理

この系ではクローニングしたDNA断片とSrf I消化したベクターを混合した後、Srf IとT4リガーゼを加えて反応させる。ベクターは、T4リガーゼの作用によって自己連結しやすいが、Srf Iによって消化され、再び線状のベクターとなる。この反応を繰り返すうちに、ベクターに組み込まれるDNA断片が増加する。

は、ssDNA調製の際に混入してくる大腸菌のDNAとRNAによって、(CA)_nリピートを含まないクローンが増加すると述べている。そこで本研究では、ssDNA調製時にDNase IとRNase Aを用いて、混入してくる大腸菌のDNAとRNAを除いた。

4) Mung bean スクレアーゼの使用

原法では、大腸菌 CJ 236 (*dut*⁻, *ung*⁻) を用いてウラシルを含むssDNAを調製し、それを鋳型として *in vitro* で、二本鎖DNAの合成を行った。これを野生型大腸菌 (*dut*⁺, *ung*⁺) に形質転換することによって、(CA)_nリピートを含むクローンの濃縮を可能とした。ウラシルを含むssDNAを鋳型として *in vitro* で合成された二本鎖DNAは、野生型大腸菌でレスキューされて増殖できる。すなわち、*ung*の産物であるuracil-DNA glycosylaseは、ウラシルとデオキシリボースの間のN-グリコシド結合の加水分解反応を触媒する酵素で、DNAの切除修復 (excision repair) の初期段階において重要な役割を果たしている。本酵素とAP-エンドヌクレアーゼの作用によってウラシル近傍に一本鎖切断が入り、ウラシルからチミンへのDNA修復が始まる。これによって、環状二本鎖DNAのウラシルは切除修復されて、正常の環状二本鎖プラスミドDNAとなり、大腸菌内で増殖する。一方、ウラシルを含むssDNAは、*dut*の産物であるdeoxyuridine triphosphataseによって消化され、野生型大腸菌では生存できない。

本研究では、ssDNAを野生型大腸菌 XL 1-Blue MRF'で調製したので、原法のような選別法を使用することができない。そこで二本鎖DNAの合成が起らなかったssDNAを除く目的で、一本鎖DNA特異的消化酵素Mung bean スクレアーゼを使用した。原法をそのままニワトリに応用した報告 (ChengとCrittenden 1994) と本研究の(CA)_n陽性クローン率 (2.1%と70%) を比較することによって、Mung bean スクレアーゼによる選別法は、原法の大腸菌株の違いを利用した選別法よりも効率的であることが示された。

最新のニワトリの(CA)。濃縮ライブラリーは、Kandpalら(1994)の方法を用いて構築されており、そのうちの約10%のクローンが(CA)。陽性である(Chengら1995)。このライブラリーでは、(CA)。陽性クローンのうち、48%で(CA)。リピーター多型検出用のPCRプライマーの設計が可能であるので、全クローンの約5%からPCRのプライマーを設計できる計算になる。本研究で作製したライブラリーについて同様の計算をすれば、Chengら(1995)のライブラリーより、約6倍効率的にPCRプライマーの設計が可能であると推察された。

残念ながら、今回作製した(CA)。濃縮ライブラリーは、約半数のクローンが他のクローンと重複する問題点を抱えていた。この原因として、制限酵素消化したニワトリゲノムDNAから、300~500 bpの断片だけを選別し、ベクターに連結したことが考えられた。この問題を解決するためには、より広い範囲のDNA断片を用いるか、超音波処理のようにランダムに切断したDNA断片をクローニングに用いることが必要と考えられる。

本研究によって、ニワトリのマイクロサテライトDNA単離の効率化が可能となった。また、マイクロサテライトDNAのゲノム中のコピー数が少ないニワトリにおいて開発された今回の方法は、他の動物のマイクロサテライトDNA単離にも応用可能と考えられる。

第5章 マイクロサテライトDNAマーカーを用いた日本鶏の類縁関係の分析

5.1 緒言

わが国には、約30品種の日本鶏が現存し、そのうち17品種が天然記念物に指定されている。それらはいずれも日本固有の動物遺伝資源として貴重なものであり、今後更なる保存と活用を図る必要がある。農林水産省では、世界レベルで遺伝資源の保存と活用を図る目的で1985年からジーンバンク事業を開始し、日本鶏の生体保存および精液の凍結保存を行っている(Takahashiら1996)。

日本鶏の遺伝的多様性を維持しつつ、効率的な保存を行うためには、各品種の遺伝的特性と品種間の類縁関係を明らかにする必要がある。日本鶏の遺伝的特性と遺伝的類縁関係に関する研究は、これまで血液型と蛋白質型などの遺伝生化学的形質をマーカーとして行われてきた(岡田ら1980; 田名部と水谷1980; 橋口ら1981; Okadaら1984)。しかしながら、蛋白質型に基づく分析(岡田ら1980; 田名部と水谷1980; 橋口ら1981; Okadaら1984)では、比較する集団によって多型を示す遺伝子座数および一座位あたりの対立遺伝子数が限られており、また日本鶏各品種間の類縁関係についてはコンセンサスが得られていない。

そこで本研究では、表現型(血液型や蛋白質型)ではなく、遺伝子本体であるDNAの多型に注目した。第4章で作製したマイクロサテライトDNA濃縮ライブラリーから得られたマイクロサテライトDNAを用いて、マイクロサテライトDNA多型に基づく日本鶏の遺伝的類縁関係について検討した。

5.2 材料と方法

5.2.1 供試材料

岩手地鶏(岩手県畜産試験場, 19個体)、会津地鶏(福島県養鶏試験場, 20個体)、佐渡地鶏(新潟県佐渡郡・西蒲原郡・中蒲原郡, 22個体)、芝鷄(新潟県西蒲原郡ほか, 16個体)、尾長鶏(高知県南国市・土佐山田市・鏡村, 22個体; 福島県三春町, 15個体)、越後南京(新潟県西蒲原郡, 12個体)、白色レグホン(農林水産省畜産試験場の卵殻強度の強弱2方向選抜鶏, 並澤ら1995)の強系(24個体)と弱系(24個体)の、7品種9集団を用いた。

5.2.2 ニワトリゲノムDNAの調製

ニワトリのゲノムDNAは、フェノールクロロホルム抽出法(Sambrookら1989)あるいはDNA抽出キット(SepaGene, 三光純薬)を用いて、血液から抽出した。

5.2.3 マイクロサテライトDNA多型の検出

本研究の第4章で作製したマイクロサテライトDNAのライブラリーから、マイクロサテライトDNAを含むクローンを無作為に選択した。今回使用した6個のマイクロサテライトDNA(CA14、

PCR 反応液 20 μ l と反応停止液 (100% 脱イオン化ホルムアミドにブルーデキストラン濃度を 5 mg/ml になるように溶解したもの) 20 μ l を混合し、熱変性 (92 $^{\circ}$ C, 3 分間) した後、自動 DNA シーケンサー (ALF II, ファルマシア) のシーケンス用ゲルに各サンプル 1 μ l を乗せ、電気泳動を行った。PCR 産物の断片長の解析は、コンピューターソフト (Fragment Manager, ファルマシア) を用いて行った。検出されたバンドのピークが 1 本ならばホモ型、2 本ならばヘテロ型と判断し (図 5-1 および 3)、各対立遺伝子を直接数えることによって、各マイクロサテライト座位における対立遺伝子頻度を求めた。

CA14
5'-CGTGGTTCGCAGCACTCGGAGCAGCCAAAGAGGGAGGCACAGTTCCCTGCAGCGAGGCTCAGCAGATAA
ATCACACAGATTTTCCCTTGTGAGCTCGGGTATCAACAGCGGCTTTTCACAGCAGCGCTTCTCCCG
GCCTTTCATCAGACACACACACACACACAAACCGCTCGCTGCAAGTTTGCTATTATGCGCTG
TTTTTCTCAGGGCGGAGCAGGAATGAGTCTCGGGCTGGGGCTCTCCCTGTCTCCCTCCATCAAG
ACGCATGAGATCCATTCTGCTGCAGCAGGGTGTGAATCAGCCCTGGCACCCCTCTCCCGG-3'

CA 20
5'-GATCAAAACAGCAAGGGCCAACTAAGSTAAAACACGTATAAGGGCAGTACGGGATGCCACCTTCGGC
CCCCGTTACTGATTGTGCAAAAGAGATGGCAGCTCAGTTGGACACACCGCCACGCACACACAGA
CACACACACACACACACAGACGCTGGCCGGCCGCGGTACCGCGTCTTCCTCAGCTCGGGCTCGCTCAG
CAGTGCTTCTTGAACGGCCGCGCTCCAGGCACGCCGGGCTCCTTCGGGGCTTCTTCGGCCGCGCTTC
TTGGCCTCCTTCCTACCTTGGCGGTGGTCTCCCGGATC-3'

CA 2 1
5' -CTTGAGCATCCTTAACAGTTACTTTTCTCTTCTCTGTCCTTCCACTGCACACACACACACACAC
ACACACTTAAGTATTGGTGAACAAACATGCTTCCCCCACTGCATTGTGCACTAGTTGCTGTGTGAAT
GCAGGACGGCCTACACCTCTCTCTAGAACGACAGTGCAGGAATTATTCATTTTGTGGCTATT
CAAGCTCAGTCCCAAGACTGATAACCACAGAGGAAGCGAGGGAATTATCTGATTATAGTCTCAGGTCC
CAGTGGAGGGAACCATATCGGAAGGT-3'

CA 28
5' - CACCTCTCTCAAGGAAGCATCAGCAGCTCCATCTTCTACTTCCTGTCAGTGTCACTCAAGTTCACTTCACTCA
TGCCTTCCCATTTCCCTATGTGCCAAACATTTACCTAATTTCTGTGTTTTTGACTACTTTCCATTTA
TACACACATACACACACACACACACTATTCCCATTTCTCCTCTCTTTCTCTGAGGAAAAA
AGGCACATTAATACACCAACCTACTCAATCTCTGCGCTTGTACGGGGCTAGAGCGGGCGG-3'

CA 28
5' - CAGCATGATCCTGTGGATGATGCTCTGCAGCGGGAAGTGTATCTCTTGTGCTTTTGAATCGCTTCCATG
AGCTGCGAGGCGACACACCGGCAGCATGCTCGTCTGCTGCCAGGGGTGGGAGCGGGGACGGTGCACGAC
TGCATGGAGAGGAGATGCCCTCAGCCACGACCCCTCTCAGCCCTACCCCTGCACCTCAGGTTCTCCAGGG
CAGCTGTCCGACCGCCCGGGCTTTTAATGCAGCTGCAGACAGACACACACACACACAGAGCCACCGT
GGGCTCTCTTTTCTGGGTGGAGGGGAAGCCCGGGCACCCGAGGAGAGGAGCTCGGAGAGCAGCAG
CTCCCCATGCACGACCTCATCTCTGGAGACTGAGCTGATCTCG-3'

CA 57
5'-TGCAGGAAATTATCAACTTTGAAACTTGACCTGACAGCCTCAAAAGGATAATTTACTGTTTGATTACC
TTAGCAAGGATACGGCTGCACACACACACACACAGTGCTTTBATTCGCTGGTGTTTGTCAACACA
TGGCCAGGCTCGCTAGTGTGTCTCTGTATTAATTCGGCTCATATTCTGCTGCCAGTATGAATGGG-3'

図5-2 使用したニワトリのマイクロサテライト DNA の塩基配列
マイクロサテライト DNA 多型検出のため、CA リピート (太字) 増幅用の PCR プライマーを設計した。太枠部分の塩基配列をもつセンスプライマーと細枠部分のリバースプライマーを合成し、センスプライマーの 5' 末端を FITC 標識した。

表5-1 PCR反応組成

ニワトリゲノム DNA	50 ng	
プライマー	各プライマー 25 pmoles	
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ミックス	各 dNTP 100 μ M	
Tris-HCl (pH 8.3)	10 mM	*
KCl	50 mM	
MgCl ₂	1.5 mM	
ゼラチン	0.001%	
Ampli Taq Gold (PERKIN ELMER)	0.025 unit	

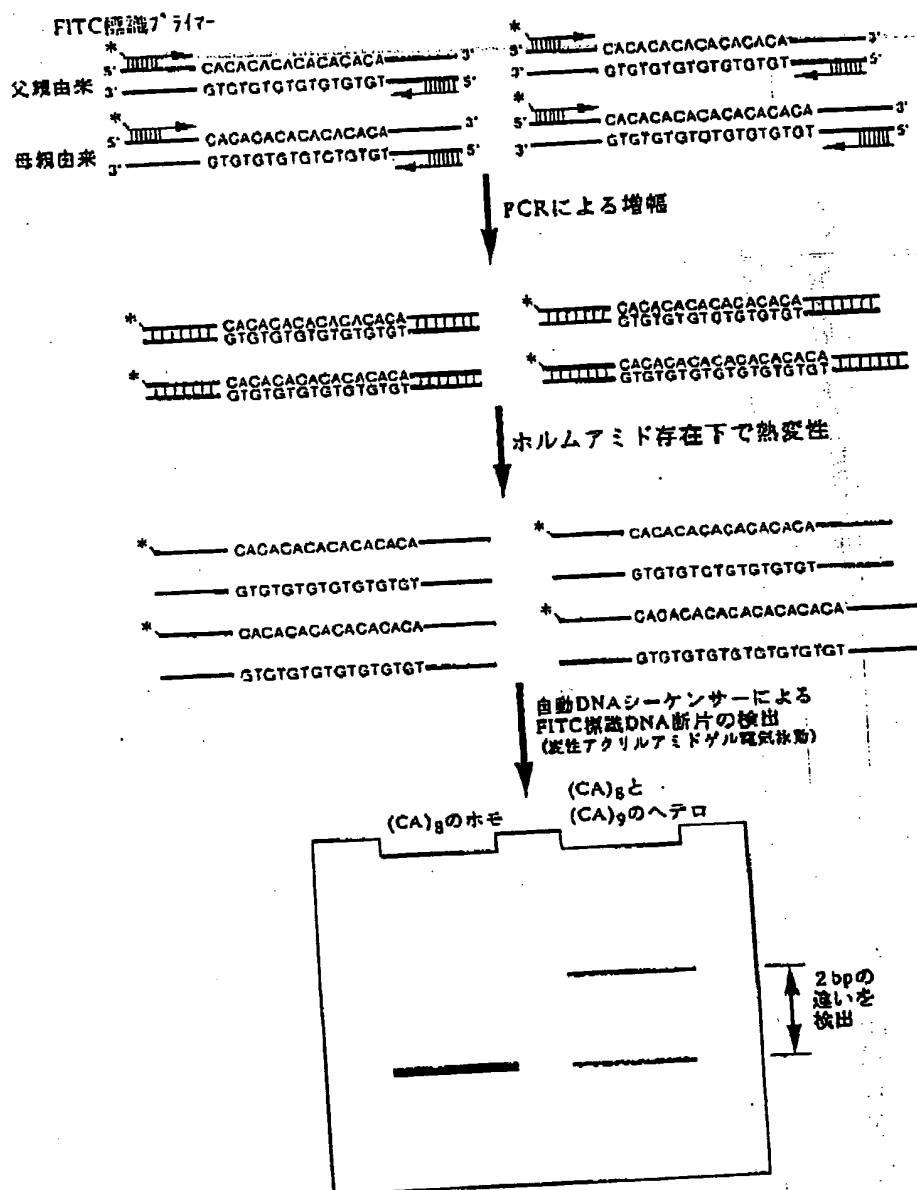
*: 96穴プレートのウェルあたり、20 μ l で反応

図5-1 マイクロサテライト DNA 多型検出の原理

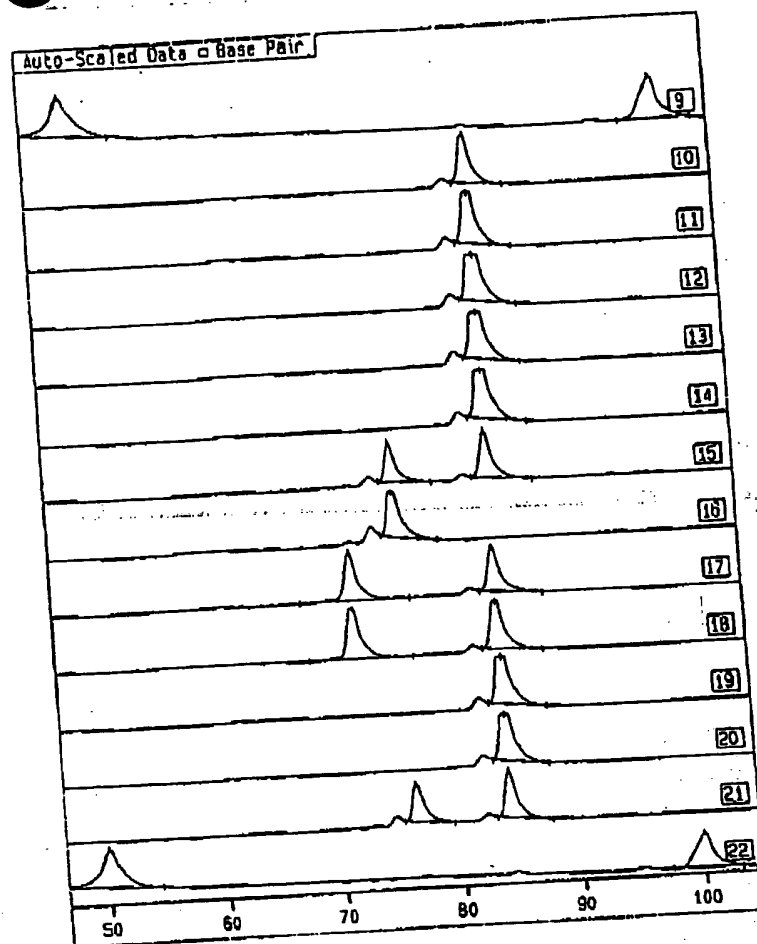


図5-3 マイクロサテライト DNA 多型の例

越後南京 (12 個体) の CA 20 座位の多型を示す。

グラフの横軸は、DNA サイズ (bp)。

レーン 9 および 22: 50 bp と 100 bp のサイズマーカー。

レーン 10~21: 調査した各個体のレーン

76 bp のホモが 1 個体、84 bp のホモが 7 個体、72 bp と 84 bp のヘテロが 2 個体、76 bp と 84 bp のヘテロが 2 個体検出された。

5.2.4 平均ヘテロ接合性

集団内における遺伝的変異の量を推定するために、座位あたりに期待される平均ヘテロ接合性(H)を Nei (1978) の小集団を対象とした式

$$H = E[2n(1 - \sum q_i^2) / (2n - 1)] / r$$

によって推定した。ここで q_i はある座位における i 番目の対立遺伝子の頻度、 n は集団内の個体数、 r は調べられた遺伝子座数を示す。

5.2.5 集団間の遺伝距離

集団間の遺伝距離は、次の 3 つの式を用いて推定した。

① Rogers (1972, D_r) の式

$$D_r = \sqrt{\frac{1}{2} \sum_{i=1}^m (x_i - y_i)^2} / r$$

ここで、 m は遺伝子座 k における対立遺伝子数、 x_i 、 y_i を対立遺伝子 i の集団 X、Y における

る遺伝子頻度, r は調べられた遺伝子座数を示す。

②Nei (1983, D_A) の式

$$D_A = \sum_{k=1}^m [1 - \sum_{i=1}^m (x_{ik} y_{ik})^{\frac{1}{2}}] / r$$

ここで, m_k は遺伝子座 k における対立遺伝子数, x_{ik} , y_{ik} を対立遺伝子 ik の集団 X , Y における遺伝子頻度, r は調べられた遺伝子座数を示す。

③Nei (1972) の標準距離 (D_S) の式

$$D_S = -\log_e I$$

$$I = j_{xy} / (j_x j_y)^{\frac{1}{2}}$$

x_i , y_i を対立遺伝子 i の集団 X と Y における遺伝子頻度としたとき, j_{xy} , j_x , j_y は調べられたすべての遺伝子座の j_{xy} , j_x , j_y の平均を示す。

$$j_{xy} = \sum x_i y_i, j_x = \sum x_i^2, j_y = \sum y_i^2 \text{ とする。}$$

平均ヘテロ接合性(H)および各遺伝距離 (D_R , D_A および D_S) の推定式の計算には, 表計算ソフト (ロータス 123) を用いた。

各遺伝距離 (D_R , D_A および D_S) に基づいて, 非加重結合法 (Sneath と Sokal 1973) を用いて, デンドログラムを作成した。

5.3 結果

調査した6つのマイクロサテライト DNA 座位全てにおいて, CA リピートの反復単位数の違いに対応した DNA 断片長多型が検出された。その1例を図5-3に示した。検出された対立遺伝子数の合計は33個, 一座位あたりの平均対立遺伝子数は5.5個であった。各座位における対立遺伝子頻度を表5-2に示した。

対立遺伝子頻度より求められた, 各品種, 各集団の平均ヘテロ接合性(H)を表5-3に示した。卵殻強度によって選抜を受けた白色レグホンの強系と弱系では, 他の品種に比べて低い平均ヘテロ接合性を示した。

次に各品種, 各集団間の遺伝距離 (D_R , D_A および D_S) を, 表5-4, -5 および -6 に示した。同一品種内の集団 (高知尾長鶏と福島尾長鶏, 白色レグホンの強系と弱系) 間の遺伝距離はきわめて近かった。また, D_R , D_A および D_S に基づいて作成したデンドログラムを, 図5-4, -5 および -6 に示した。 D_R および D_A に基づくデンドログラム (図5-4 および -5) は, ほぼ一致した。すなわち, 日本鶏種と白色レグホンは明確に異なるクラスターに分けられた。日本鶏のグループは, 高知尾長鶏, 福島尾長鶏, 岩手地鶏および越後南京から構成されるクラスターと, 佐渡群地鶏および芝鶏から構成されるクラスターに分けられた。また, 会津地鶏は他の日本鶏種とは離れた関係となった。 D_S に基づくデンドログラム (図5-6) では, 岩手地鶏が, 日本鶏種のクラスターではなく, 白色レグホンと一つのクラスターを形成した。

5.4 考察

本研究結果から, マイクロサテライト DNA はきわめて多型性が高いことが示され, 集団間の遺伝的類縁関係解明のための有効なマーカーとなることが明らかになった。またマイクロサテライト DNA 多型は, すべて共優性遺伝子として扱えるので, 優劣関係のある場合の蛋白多型座位をマーカーに用いるよりも有利である。

本研究と同じ日本鶏種の血液型と蛋白多型座位について調査した報告 (尾長鶏, 岡田ら, 1993; 佐渡群地鶏, 芝鶏および越後南京, 岡田ら, 1995) の平均ヘテロ接合度を見ると, 尾長鶏群の平均ヘテロ接合度はかなり低い値 (0.056~0.307) を示した。佐渡群地鶏, 芝鶏および越後南京のヘテ

表5-2 各マイクロサテライト DNA 座位における対立遺伝子頻度

MS座位	fragment 長	岩手地鶏 (19) [38]	会津地鶏 (20) [40]	佐渡地鶏 (22) [44]	芝鶏 (16) [32]	高知尾長鶏 (22) [44]	福島尾長鶏 (15) [30]	越後南京 (12) [24]	白レグ(強系) (24) [48]	白レグ(弱系) (24) [48]
CA 14	119 bp	0	1.000	0.045	0	0.091	0.133	0.500	0.250	0.104
	123 bp	0	0	0.091	0	0	0	0.292	0.333	0.146
	125 bp	0.132	0	0.273	0.375	0.091	0.300	0	0	0
	127 bp	0.053	0	0.591	0.469	0.818	0.567	0.208	0	0
	129 bp	0.816	0	0	0.156	0	0	0	0.417	0.750
CA 20	72 bp	0	0	0	0	0	0	0.083	0	0
	74 bp	0	0	0.091	0	0	0	0	0	0
	76 bp	0	0.550	0	0.344	0	0.033	0.167	0	0
	80 bp	0	0	0.114	0	0	0	0	0	0
	82 bp	0	0.450	0.023	0	0	0.100	0	0.396	0.458
	84 bp	1.000	0	0	0.031	0.500	0.733	0.750	0	0
	86 bp	0	0	0.523	0	0.318	0.133	0	0	0
	88 bp	0	0	0	0.406	0.159	0	0	0.604	0.542
	98 bp	0	0	0.250	0	0	0	0	0	0
	100 bp	0	0	0	0.219	0.023	0	0	0	0
CA 21	144 bp	0	0	0.909	0.125	0.114	0	0.208	0	0
	146 bp	0.184	0	0	0.031	0	0	0.542	0	0
	148 bp	0	0	0	0	0.023	0	0	0	0
	150 bp	0.263	1.000	0	0.563	0.227	0.200	0.083	0	0.250
	152 bp	0.368	0	0	0	0.614	0.800	0	0	0
	158 bp	0.184	0	0.091	0.281	0.023	0	0.167	1.000	0.750
CA 26	113 bp	0.211	0.300	0.182	0	0.045	0.067	0	0	0
	119 bp	0.763	0.150	0.273	0.344	0.909	0.867	0.458	0.854	0.583
	121 bp	0.026	0	0.455	0.063	0.023	0	0.542	0.146	0
	123 bp	0	0	0.091	0.594	0	0	0	0	0.417
	125 bp	0	0.550	0	0	0.023	0.067	0	0	0
CA 28	142 bp	0.605	0.325	0.841	0.656	0.318	0.300	0	0.958	0.958
	144 bp	0.395	0.675	0.159	0.344	0.682	0.700	1.000	0.042	0.042
CA 57	94 bp	0.211	0.400	0.864	0.969	0.841	0.833	0.708	0	0
	96 bp	0.711	0.450	0	0.031	0.091	0.133	0	1.000	1.000
	98 bp	0	0.150	0.136	0	0.068	0.033	0	0	0
	100 bp	0.079	0	0	0	0	0	0	0	0
	102 bp	0	0	0	0	0	0	0.292	0	0

() : 個体数
[] : 対立遺伝子

表5-3 各集団の平均ヘテロ接合性

MS 座位	平均ヘテロ 接合性	岩手地鶏	会津地鶏	佐渡群地鶏	芝 鶏	高知尾長鶏	福島尾長鶏	越後南京	白レグ (強系)	白レグ (弱系)
CA 14	h (CA 14)	0.323	0	0.579	0.635	0.321	0.591	0.649	0.667	0.414
CA 20	h (CA 20)	0	0.508	0.658	0.690	0.637	0.448	0.420	0.488	0.507
CA 21	h (CA 21)	0.747	0	0.169	0.607	0.571	0.331	0.656	0	0.383
CA 26	h (CA 26)	0.383	0.600	0.693	0.542	0.174	0.248	0.518	0.254	0.496
CA 29	h (CA 28)	0.491	0.450	0.274	0.466	0.444	0.434	0	0.082	0.082
CA 57	h (CA 57)	0.457	0.631	0.241	0.063	0.286	0.297	0.431	0	0
平均ヘテロ接合性 (h の総和の平均)	H	0.400	0.365	0.436	0.500	0.406	0.392	0.446	0.249	0.314

表5-4 Rogers (1972) の式により求めた遺伝距離

	1	2	3	4	5	6	7	8
	岩手地鶏	会津地鶏	佐渡群地鶏	芝 鶏	高知尾長鶏	福島尾長鶏	越後南京	白レグ(強系)
会津地鶏	0.587							
佐渡群地鶏	0.609	0.654						
芝 鶏	0.509	0.526	0.373					
高知尾長鶏	0.427	0.554	0.426	0.403				
福島尾長鶏	0.388	0.549	0.465	0.419	0.124			
越後南京	0.510	0.548	0.517	0.523	0.424	0.395		
白レグ(強系)	0.460	0.672	0.617	0.576	0.625	0.642	0.681	
白レグ(弱系)	0.416	0.645	0.615	0.492	0.660	0.675	0.717	0.161

表5-5 Nei (1983) の式により求めた遺伝距離

	1	2	3	4	5	6	7	8
	岩手地鶏	会津地鶏	佐渡群地鶏	芝 鶏	高知尾長鶏	福島尾長鶏	越後南京	白レグ(強系)
会津地鶏	0.514							
佐渡群地鶏	0.559	0.611						
芝 鶏	0.374	0.484	0.343					
高知尾長鶏	0.267	0.457	0.304	0.283				
福島尾長鶏	0.232	0.376	0.400	0.352	0.057			
越後南京	0.444	0.514	0.458	0.429	0.342	0.370		
白レグ(強系)	0.398	0.554	0.601	0.499	0.571	0.614	0.636	
白レグ(弱系)	0.365	0.505	0.647	0.387	0.582	0.610	0.724	0.082

表5-6 Nei (1975) の式により求めた遺伝距離

	1	2	3	4	5	6	7	8
	岩手地鶏	会津地鶏	佐渡髭地鶏	芝鶏	高知尾長鶏	福島尾長鶏	越後南京	白レグ(強系)
会津地鶏	1.057							
佐渡髭地鶏	1.176	1.403						
芝鶏	0.834	0.740	0.423					
高知尾長鶏	0.481	0.961	0.491	0.408				
福島尾長鶏	0.370	0.895	0.672	0.494	0.040			
越後南京	0.667	0.762	0.818	0.752	0.409	0.382		
白レグ(強系)	0.495	1.136	1.149	0.870	1.103	1.181	1.478	
白レグ(弱系)	0.418	1.026	1.230	0.683	1.239	1.307	1.929	0.067

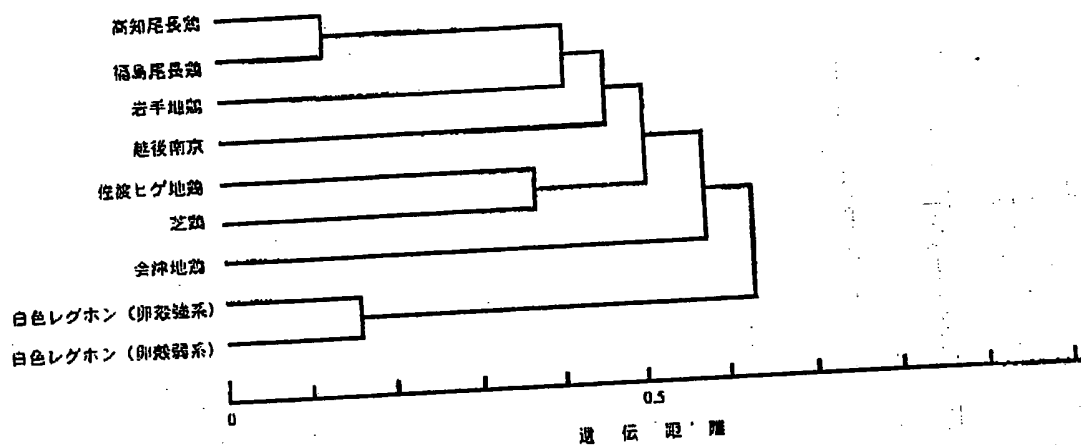


図5-4 Rogers (1972) の遺伝距離より求めたデンドログラム

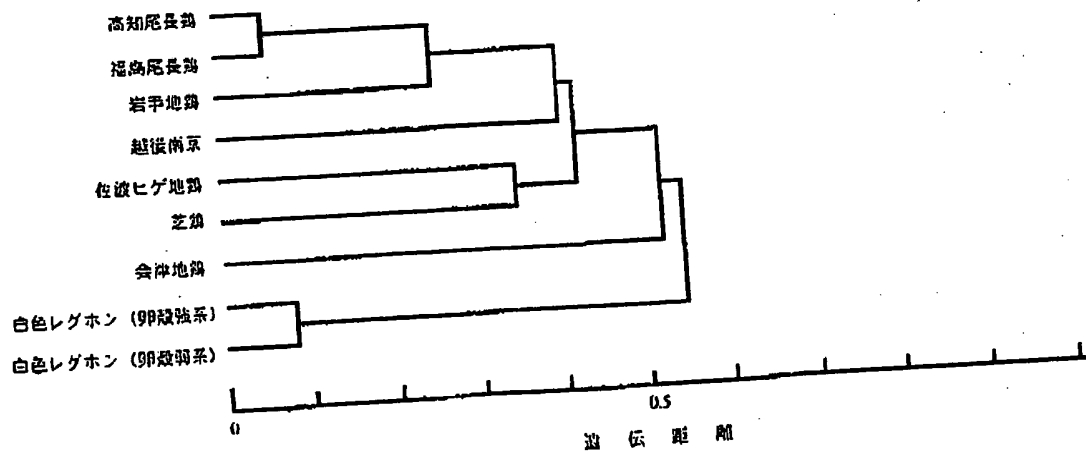


図5-5 Nei (1983) の遺伝距離より求めたデンドログラム

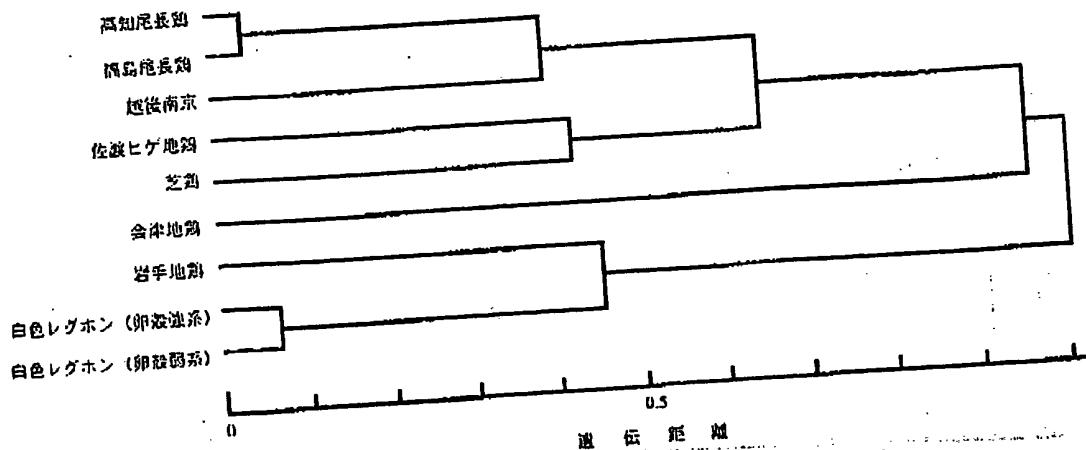


図5-6 Nei (1972) の標準遺伝距離より求めたデンドログラム

ロ接合度は、それぞれ 0.3441, 0.3630, 0.4063 であり、比較的高い値であった。岡田ら (1995) は、尾長鶏の平均ヘテロ接合度が低い原因として、過去に集団の大きさが極度に小さくなったことによる瓶首効果を示唆した。マイクロサテライト DNA をマーカーに用いた本研究では、尾長鶏の平均ヘテロ接合度は高く、岡田ら (1993) の報告と必ずしも一致しなかった。この原因として、マイクロサテライト DNA をマーカーに用いた場合、蛋白多型よりも検出される対立遺伝子数が多いことが考えられた。

本研究では、品種間、集団間の遺伝距離の推定に 3 つの式を使用した。その結果、標準遺伝距離の式 (D_s ; Nei 1972) より求めたデンドログラムは、他の 2 つの推定式 (D_R ; Rogers 1972, D_A ; Nei 1983) より求めたデンドログラムと異なる結果となった。 D_s の式では、対立遺伝子 i の集団 X , Y における遺伝子頻度 x_i と y_i を乗じた $x_i y_i$ が算出の基礎となっている。集団間の対立遺伝子が重複しない遺伝子座においては、集団間の遺伝距離は大きくなるべきだが、 D_s の式を用いると $x_i y_i$ は 0, $x_i y_i$ の総和である j_{xy} は 0 となり、最終的にその遺伝子座の遺伝距離は 0 となる。マイクロサテライト DNA では、遺伝子座あたりの対立遺伝子数が多く、集団間の対立遺伝子がまったく重複しない場合や、一部分しか重複していない場合があり、 D_s の式では、対立遺伝子頻度の情報を十分に生かすことができない。 D_R の式 (Rogers 1972) では、集団間の対立遺伝子頻度の差を二乗した値 $(x_{ia} - y_{ia})^2$ が算出の基礎となるので、対立遺伝子頻度の情報をすべて活用することになり、集団間の対立遺伝子が重複しない遺伝子座の遺伝距離は 1 に近い大きな値となる。 D_A の式は、 D_s の式と同様に対立遺伝子頻度の乗じた $x_{ia} y_{ia}$ が算出の基礎となるが、1 から $x_{ia} y_{ia}$ の平方根の総和を引くので、集団間の対立遺伝子が重複しない遺伝子座の遺伝距離は 1 と最大になる。対立遺伝子が一部分しか重複しない場合には、対立遺伝子の情報の一部しか算出に貢献しないが、重複する対立遺伝子数が多い場合と重複する対立遺伝子頻度が高い場合には、結果的に D_A は小さい値となり、 D_s の式よりも、対立遺伝子頻度の情報を反映しているように思われる。そこで、本論文では D_R (Rogers 1972) と D_A (Nei 1983) の遺伝距離の推定式に基づいて議論したい。

本研究において、岩手地鶏は尾長鶏と比較的近い関係にあり、他の地鶏系の品種 (芝鶏、佐渡群地鶏、会津地鶏) とは離れていた。このことから、岩手地鶏は他の地鶏と起源が大きく異なっている可能性が示唆されたが、調査した日本鶏の品種数および品種あたりの個体数が少ないので、さらに検討する必要がある。また、芝鶏と佐渡群地鶏は遺伝的にも近い関係にあることが示唆され、血液型や蛋白多型座位に基づく報告 (岡田ら 1995) と一致した。

本研究では、越後南京は尾長鶏と岩手地鶏と近い関係に、会津地鶏はいずれの日本鶏種とも遠い

関係にあった。今回は調査した日本鶏種が少なく、越後南京と会津地鶏の他の日本鶏種との類縁関係は必ずしも明らかではないが、調査する鶏種に軍鶏および地鶏系の品種を加えれば、他の鶏種との類縁関係がさらに明確になると思われた。

本研究によって、鶏種間の遺伝的類縁関係を明らかにするマーカーとして、マイクロサテライト DNA が有効であることが示唆された。

第6章 総合考察

本研究では、家畜・家禽の DNA 多型マーカーの候補として、ヒトの遺伝連鎖解析に広く用いられている SINEs とマイクロサテライト DNA に着目した。そして、ブタの SINEs の PRE-1 配列、ニワトリのマイクロサテライト DNA の単離と構造解析を行い、それぞれの DNA 多型マーカーとしての有用性の検証を行った。そこで、SINEs とマイクロサテライト DNA のどちらが家畜・家禽の DNA 多型マーカーとして優れているのか、代表的な家畜・家禽であるウマ、ウシ、ブタ、ニワトリを中心に検討する。

家畜の SINEs として、ウマ (ERE-1 配列, Sakagami ら 1994)、ウシ (Bov-A 2, Bov-tA および Bov-B 配列, Lenstra ら 1993)、ブタ (PRE-1 配列, Singer ら 1987; Takahashi ら 1992) の報告がある。ERE-1 配列, Bov-tA 配列および PRE-1 配列に tRNA 由来の配列が存在する以外、これらの塩基配列に共通性は認められない。SINEs の DNA 多型マーカーとしての有用性は、各種 SINEs の塩基配列のバリエーションと、ハプロイドゲノムあたりのコピー数に左右されると推測される。すなわち、塩基配列のバリエーションが少ない SINEs は、多型性も少くないことが予想される。またコピー数が多ければ、それに比例して多数のマーカーを得ることが可能であろう。本研究で明らかにしたブタの PRE-1 配列は、塩基配列のバリエーションが約 30% 認められ、コピー数も 10^4 コピーと多いので、DNA 多型マーカーとしてかなり期待される。ウシの SINEs は、塩基配列のバリエーション (15~26%)、コピー数 (Bov-A 2: 2.2×10^4 コピー、Bov-tA: 2.85×10^4 コピー、Bov-B: 6×10^4 コピー) とともに PRE-1 配列に近く、同様に DNA 多型マーカーとして期待される。一方、ウマの ERE-1 配列は、塩基配列のバリエーション (6.5%)、コピー数 ($2 \sim 8 \times 10^4$ コピー) とともに少なく、マーカーとしてはあまり期待できそうにない。

SINEs を DNA 多型マーカーとする場合、次に問題になるのはその多型検出法である。DNA 塩基配列のわずかな違いを検出する方法として、本研究で検討した PCR-SSCP 法のほかに、変性勾配ゲル電気泳動法 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) や、温度勾配ゲル電気泳動法 (temperature gradient gel electrophoresis, TGGE) がある (Lessa と Applebaum, 1993)。DGGE 法では、変性剤 (尿素) に濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルで DNA 断片を電気泳動する。ある変性剤濃度のところで DNA 断片は解離し、部分的に一本鎖 DNA になるので泳動中の移動度が遅くなる。DNA 断片の解離点はその塩基配列に依存するので、塩基配列の違いを移動度の違いとして検出できる。しかしながら、DGGE 法で作成するゲルは、厳密には毎回異なっており、その泳動結果はゲルの作成技術に左右されると思われる。TGGE 法は、同様に DNA 断片の解離特性を利用するもので、変性剤の濃度勾配ではなく、温度勾配をつけながら電気泳動する。DGGE 法と同様に、ある温度のところで DNA 断片は解離し、部分的に一本鎖 DNA になるので泳動中の移動度が遅くなる。この方法は、均一なゲルを使用する点で DGGE 法より優れているが、温度勾配をつけるための専用の電気泳動装置が必要である。本研究では、高感度な銀染色法を DNA バンドの検出に応用することによって、簡便かつ安全な PCR-SSCP 法を開発した。しかしながら、いずれの多型検出法においても、塩基配列の違いを 100% 検出する保証はなく、各研究室で所有している電気泳動装置や、電気泳動条件が異なる場合には、データの再現性に問題がある。例えば PCR-SSCP 法では、アクリルアミドゲルの濃度、アクリルアミドとビスアクリルアミドの比率、ゲルに添加するグリセロール濃度、泳動中の温度条件などによって、泳動パターンが変わってくることが

報告されている(Oritaら 1990; HayashiとYandell 1993)。このことは、電気泳動条件を各PCR産物に合わせて細かく設定すれば、かなりの確率で多型を検出できることを示唆するが、家系解析において多数の検体を処理する場合には、電気泳動条件の変更は困難である。もし、塩基配列の違いを100%検出しようとするならば、PCR産物の塩基配列を直接決定すべきであろう。また、二本鎖DNAの解離(DGGEおよびTGGE法)や、一本鎖DNAの高次構造に依存(PCR-SSCP法)する方法では、通常の電気泳動で使用するようなDNAサイズマーカー(λ /HindIII, ϕ X174/HincIIなど)の設定が困難である。すなわち、DNAサイズマーカー自体が解離しながら、あるいは高次構造をとりながら電気泳動されるため、どのバンドがどのサイズのマーカーに相当するのか、判別が難しい。このことは、研究室間のデータの共有を困難にするとと思われる。一方、(CA)リピートを代表とするマイクロサテライトDNAは、哺乳動物においてハプロイドゲノムあたり約10⁶コピー存在する。コピー数の面から見れば、ウシ、ブタの場合、マイクロサテライトDNAの方がSINEsよりも劣っている。しかしながら、マイクロサテライトDNAの多型は、データの再現性の面でSINEsの多型より、はるかに優れている。すなわち、マイクロサテライトDNA多型は、その反復単位数に対応したDNA断片の長さの多型として検出されるので、自動DNAシーケンサーを所有するような研究室間ではデータの共有が可能である。データの再現性を優先すれば、ウシとブタでは、マイクロサテライトDNAを主なマーカーとして、SINEsをマイクロサテライトDNAを補完するマーカーとして利用するのがよいと考えられる。SINEsの多型があまり期待できないウマでは、マーカーとしてマイクロサテライトDNAを選択すべきであろう。

家畜に比べて、ニワトリのSINEsおよびマイクロサテライトDNAのゲノム中のコピーは少ない。ニワトリのSINEsであるCR1配列、およびマイクロサテライトDNAのハプロイドゲノムあたりのコピー数は、それぞれ1,500~7,000コピー(Stumphら 1981)と7,500コピー(Crookmansら 1993)である。またニワトリのマイクロサテライトDNAは、その反復単位数が少なくても多型性に富むことが報告されており(ChengとCrittenden 1994)、本研究でもそれを確認した。したがって、コピー数の面と多型性の面から、ニワトリではマイクロサテライトDNAをマーカーとして選択すべきである。本研究においては、ニワトリのマイクロサテライトDNAを効率的に単離する方法を開発した。マイクロサテライトDNAの少ないニワトリにおいて開発されたこの方法は、マイクロサテライトDNAを有する全ての動物に応用可能と考えられる。本法の、家畜種・ニワトリ以外の家禽種への積極的応用が期待できる。

また本研究によって、マイクロサテライトDNAは、集団間、品種間の類縁関係解明のための強力な武器になることが示された。家畜・家禽の遺伝的類縁関係に関する研究は、これまで血液型と蛋白多型座位をマーカーとして行われてきた。遺伝子の表現型を検出する従来法をDNAレベルで考えれば、アミノ酸をコードするコドンの違いを多型として間接的に検出していることになる。しかしながら、多くの突然変異では、蛋白質のアミノ酸配列はほとんど変化しない。これは一つのアミノ酸が複数のコドンによって指定されている場合が多いためである。また、正常な蛋白質を合成できないような突然変異が起こった場合には、致死的に作用すると考えられる。したがって、従来法では、実際に起こっているDNAの変異を多型として検出する確率はかなり低いと考えられ、技法的には、実際に起こっているDNAの変異を多型として検出する方法は、その基本単位的に限界がある。一方、マイクロサテライトDNAをマーカーとして用いる方法は、その基本単位的に(CAなど)のリピート回数の多型を検出するものであり、DNAを直接検出している点で、従来法よりも優れている。マイクロサテライトDNAの存在自体は生物にとって中立であり、また本研究結果からも、マイクロサテライトDNAは多型性に富んでいることは明らかである。さらに、各動物種のゲノムが持つマイクロサテライトDNAのコピー数を上限として、調査するマイクロサテライトDNA座位数を増やすことができる点で、マイクロサテライトDNAマーカーを用いる方法は、従来法よりも優れている。本研究では、6つのマイクロサテライトDNA座位の対立遺伝子頻度に基づいて日本鶏の類縁関係を推定したが、今後、調査するマイクロサテライトDNAの遺伝子座位数と、調査する各品種の個体数を増やすことによって、より正確に日本鶏種の類縁関係を推

定できると思われた。

家畜・家禽において、量的形質遺伝子座 (QTL) を遺伝的マーカーを用いて特定する研究が行われている (Andersson ら 1994; Georges ら 1995)。QTL の位置は、染色体上に仮定した QTL とマーカーとの連鎖関係を利用して、形質の表現型の値と関係の深いマーカーの位置を検索することによって行われる。実験動物では、対象とする形質が異なる近交系の F₁ をつくり、さらに F₁ 内での交配による F₂ 集団、あるいは F₁ と親の近交系の戻し交雑集団をつくることによって、QTL の推定が可能である。これは、一つの遺伝子座に限定すれば、AA という遺伝子型をもつ近交系と、aa という遺伝子型をもつ近交系の交配でつくられる F₁ は、すべて Aa という遺伝子型を持ち、F₁ 同士の交配による F₂ では AA, Aa, aa の遺伝子型、戻し交雑では AA と Aa の遺伝子型となるので、各遺伝子型の存在確率をマーカーとの連鎖関係から推定できるからである。家畜・家禽においては、マウスなどの実験動物で定義されているような近交系は存在しないが、ブタにおいて、同様の趣旨でかけ離れた品種の交雑を基とした、F₂ あるいは戻し交雑集団 (標準家系) の作成の試みがある (Andersson ら 1994; 農林水産省畜産試験場ほか 1996)。一方、家畜の中でも、ウシは世代間隔が長く、標準家系の作成が困難である。そこで乳牛では、後代検定などにより種雄牛について正確度の高い評価が行われていることから、QTL 解析は家系内あるいはいくつかの家系内情報の集積によって行われている (Georges ら 1995)。

また、QTL と連鎖した遺伝的マーカーの情報を利用することによる選抜 (Marker-assisted selection, MAS) が期待され、MAS の有効性について検討したシミュレーションが報告されている (Kearsey と Hyne 1994; Wu と Li 1994; 向井と塗木 1996)。これらのシミュレーションでは、近交系を基にした標準家系と、2 対立遺伝子が存在するマーカー座位を想定しているが、家畜・家禽集団では、本研究のマイクロサテライト DNA マーカーのように、対立遺伝子数は 3 個以上で、対立遺伝子頻度に偏りがあるのが一般的である。その場合には、推定すべきマーカーの効果の組み合わせが急激に増加するため、マーカーと QTL の連鎖関係の推定に必要な集団がシミュレーションより大きくなることが推察される。またニワトリを除く家畜・家禽では、近交系による標準家系の構築は困難なので、現実の集団に対する MAS の効果は、シミュレーションの結果よりも低下すると思われる。いずれにしろ、MAS を行うためには QTL とマーカーとの関係を分析し、QTL の位置と効果の大きさを正確に推定する必要がある。また、現実的な条件を考慮したシミュレーション研究が必要と思われる。これらは今後の研究課題である。

謝 辞

本論文をとりまとめるにあたり多大の御指導と多くの御助言をいただきました。広島大学、山本義雄教授に深甚の謝意を表します。また、多くの御助言をいただきました。広島大学、寺田隆登教授、松田治男教授、荒井克俊助教授、都築政起助教授、ならびに佐賀大学、岡田育穂教授に深甚の謝意を表します。

本研究の開始にあたって多くの御助言をいただきました。農林水産省畜産試験場、安江博上席研究官、農林水産省東北農業試験場、栗田崇家畜育種研究室長に深く感謝いたします。

本研究を遂行しとりまとめるにあたり、多大の御協力と御助言をいただきました。農林水産省農業生物資源研究所、大石孝雄前遺伝資源第二部長に深く感謝いたします。

本研究のとりまとめにあたり、多大の御指導と御激励をいただきました農林水産省畜産試験場、古川力計量遺伝育種研究室長に深く感謝いたします。

本研究のとりまとめにあたり、研究環境を整えていただき、また多大の御指導と御助言をいただきました。農林水産省農業生物資源研究所、長嶺慶隆動物探索研究チーム長、並澤圭二郎主任研究官に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、実験補助をしていただきました。北中あすか女史、米栖美喜女史に深く感謝いたします。

摘 要

家畜・家禽の遺伝連鎖地図作製に必要な遺伝連鎖マーカーの候補として、簡便かつ安価なPCR (polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応) を応用したDNA多型検出法が期待できるSINEs (short interspersed elements) とマイクロサテライトDNAに注目し、その単離および構造解析を行い、マーカーとしての有用性について検討した。その過程において、安全かつ高感度な銀染色によるDNA多型検出法、および効率的なマイクロサテライトDNAの単離法を開発した。

ブタの遺伝連鎖マーカーの候補としてSINEsに注目し、その単離および構造解析を行った。ブタのゲノムDNAをプローブとして用いることによって、ブタのλファージライブラリーから反復配列を含むクローンを単離した。2個のλファージクローンから、3つのDNA断片を選択し、その全長の塩基配列を明らかにした。その結果、3つのDNA断片にはSingerら(1987)が最初に報告したPRE-1 (Porcine Repeated Elements-1) 配列が6個存在することが明らかになった。本研究によって明らかになったPRE-1配列の特徴は次の通りである：

- ① 3'末端にポリA配列を持つ長さ約230 bpの配列である。
- ② 塩基配列のバリエーションが約30%認められる。
- ③ 少なくともヒト、マウスおよびウシのゲノムDNAには、PRE-1配列とハイブリダイズする配列は存在せず、ブタ特異的配列と推察される。
- ④ ブタのハプロイドゲノムあたり約 10^6 コピー存在する。
- ⑤ アルギニン tRNA とホモロジーの高い領域が存在し、その起源としてアルギニン tRNA が示唆される。

PRE-1配列のゲノム中のハプロイドゲノムあたりのコピー数や塩基配列のバリエーションに富んでいる点など、その特徴がヒトのAlu配列と似ていることから、Alu配列に応用されているPCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism) 法によるPRE-1配列多型の検出を行った。その前段階において、Oakleyら(1980)の銀染色法にアルカリ処理を加えた、簡便かつ高感度な銀染色法を開発した。これによって、非アイトープのPCR-SSCP法を確立した。この方法を用いて、特定座位のPRE-1配列の解析を行ったところ、PRE-1配列の各対立遺伝子対に対応するバンドが検出された。すなわち、バンドが2本検出された個体はホモ、バンドが4本または3本検出された個体はヘテロ接合体を形成していると推測された。また家系解析において、PRE-1配列の各対立遺伝子対に対応するバンドの遺伝様式を明らかにすることによって、PRE-1配列をマーカーとした遺伝連鎖解析が可能であることが示された。

(CA)_nリピートを代表とするマイクロサテライトDNAのゲノムあたりのコピー数が少ないニワトリにおいて、Ostranderら(1992)の方法を改変することによって、その効率的な単離法を開発した。改良点は次の4つである：

- ① pBluescript (Stratagene) に代えて、pCR-Script (Stratagene) ベクターを使用することによって、脱リン酸化処理を施したDNA断片のクローニング効率を上げた。
- ② 大腸菌 CJ236 に代えて、XL1-Blue MRF'を使用することによって、形質転換効率を上げた。
- ①と②の改良によって、プライマー伸長反応に供与するクローン数を飛躍的に増加させた。
- ③ 形質転換したXL1-Blue MRF'から一本鎖DNAを調製する際、DNase I と RNase A を使用して、大腸菌のDNAとRNAの混入を防いだ。
- ④ プライマー伸長反応後、一本鎖DNA特異的分解酵素であるMung beanヌクレアーゼを作用させることによって、マイクロサテライトDNAを含むクローンのin vitroにおける選別を可能にした。これらの改良によって構築されたニワトリの(CA)_n濃縮ライブラリー (CA)_n-enriched library) は、その70%のクローンが(CA)_nリピート陽性を示した。シーケンス解析の結果、陽性クローンは、すべて(CA)_nリピートを含んでおり、平均CAリピート回数は13.1回であった。これらの結果から、開発した方法はニワトリでこれまで報告されたマイクロサテライトDNAの単

離法に比べて、約 6 倍効率的であることが示された。また、マイクロサテライト DNA のゲノム中のコピー数が少ないニワトリにおいて開発されたこの方法は、そのコピー数が多い他の動物のマイクロサテライト DNA 単離にも応用可能と考えられた。

マイクロサテライト DNA 多型をマーカーとして、日本鶏の遺伝的特性と品種間の類縁関係を分析した。前述の (CA)_n 濃縮ライブラリーから、無作為に 6 個のマイクロサテライト DNA クローンを選択し、その塩基配列を明らかにした。その情報を基に、マイクロサテライト DNA 多型検出用の PCR プライマーを設計した。そして、岩手地鶏、会津地鶏、佐渡群地鶏、芝鶏、尾長鶏 (2 集団)、越後南京および白色レグホン (2 集団) の 7 品種 9 集団を材料として、各マイクロサテライト DNA 遺伝子座の長さの多型を、自動 DNA シーケンサーを用いて検出した。その結果、本研究で単離したニワトリのマイクロサテライト DNA は、多型性に富んでいることが確認された。Rogers (1972) と Nei (1983) の式で求めた遺伝距離に基づいて、デンドログラムを作成したところ、日本鶏種と白色レグホンは明確に異なるクラスターに分けられた。また日本鶏のグループは、尾長鶏、岩手地鶏および越後南京から構成されるクラスターと、佐渡群地鶏および芝鶏から構成されるクラスターに分けられ、会津地鶏は他の日本鶏種とは離れた。このことから、ニワトリの集団間あるいは品種間の遺伝的類縁関係解明のための多型マーカーとして、マイクロサテライト DNA は有用であることが示された。

引用文献

- 1) Anderson, L., C. S. Haley, H. Ellegren, S. A. Knott, M. Johansson, K. Andersson, L. Andersson - Eklund, I. E-Lijia, M. Fredholm, I. Hansson, J. Hakansson and K. Lundstrom. 1994. Genetic mapping quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 263: 1771-1774.
- 2) Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83.
- 3) Beidler, J. L., P. R. Hilliard and R. L. Rill. 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.* 126: 374-380.
- 4) Benton, W. D. and R. W. Davis. 1977. Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196: 180-182.
- 5) Britten, R. J. and D. E. Kohne. 1986. Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529-540.
- 6) Cheng, H. H. and L. B. Crittenden. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poult. Sci.* 73: 539-546.
- 7) Cheng, H. H., I. Levin, R. Vallejo, H. Khatib, J. B. Dodgson, L. B. Crittenden and J. Hillel. 1995. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poult. Sci.* 74: 1855-1874.
- 8) Cohen, I. H., H. S. Chan, R. K. Track and K. K. Kidd. 1990. Human gene map. In: *Genetic Maps*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 9) Crooijmans, R. P. M. A., A. J. A. van Kampen, J. J. van der Poel and M. A. M. Groenen. 1993. Highly polymorphic microsatellites markers in poultry. *Anim. Genet.* 24: 441-443.
- 10) Daniels, G. R. and P. L. Deininger. 1985. Repeat sequence families derived from mammalian tRNA genes. *Nature* 317: 819-822.
- 11) Enquist, L. and N. Stenberg. 1979. In: *Methods in Enzymology*, vol.68, Academic Press. New York. pp.281-298.
- 12) Feinberg, A. P. and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- 13) Friendewey, D., T. Dingermann, L. Cooley and D. Soell. 1985. Processing of precursor tRNAs

- in *Drosophila*: Processing of the 3' end involves an endonucleolytic cleavage and occurs after 5' end maturation. *J. Biol. Chem.* 260: 449-454.
- 14) Gamulin, V., J. Mao, B. Appel, M. Sumner-Smith, F. Yamao and D. Soell. 1983. Six *Schizosaccharomyces pombe* tRNA genes including a gene for a Lys-tRNA with an intervening sequence which cannot base-pair with the anticodon. *Nucl. Acids Res.* 11: 8537-8546.
 - 15) Georges, M., D. Nielsen, M. Mackinnon, A. Mishra, R. Okimoto, A. T. Pasquino, L. S. Sargeant, A. Sorensen, M. R. Steele, X. Zhao, J. E. Womack and L. Hoeschel. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139: 907-920.
 - 16) 橋口 勉・恒吉 満・西田隆雄・東上床久司・平岡栄一 1981. 血液蛋白質型からみた鶏の遺伝子構成. *日畜会報* 52: 717-729.
 - 17) Hayashi, K. and D. W. Yandell. 1993. How sensitive is PCR-SSCP? *Human Mut.* 2: 338-346.
 - 18) Iizuka, M., S. Mashiyama, M. Oshimura, T. Sekiya and K. Hayashi. 1992. Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. *Genomics* 12: 139-146.
 - 19) INRA. 1996. Proceedings of XXVth International Conference on Animal Genetics.
 - 20) Ishibashi, M., H. Yasue and K. Fujinaga. 1980. The oncogenicity of avian adenoviruses. 1. An unusually large number of viral DNA molecules in some tumors, and virus-specific T-antigenic proteins. *Virology* 106: 349-360.
 - 21) Jagadeeswaran, P., B. G. Forget and S. M. Weissman. 1981. Short interspersed repetitive DNA elements in Eucaryotes: Transposable DNA elements generated by reverse transcription of RNA pol III transcripts? *Cell* 26: 141-142.
 - 22) Kandpal, R. P., G. Kandpal and S. M. Weissman. 1994. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 88-92.
 - 23) Karagoyozov, L., I. D. Kalcheva and V. M. Chapman. 1993. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucl. Acids Res.* 21: 3911-3912.
 - 24) Kearsley, M. J. and V. Hyne. 1994. QTL analysis: a simple marker-regression approach. *Theor. Appl. Genet.* 89: 698-702.
 - 25) Keith, G. K. 1984. The primary structure of two arginine tRNAs (anticodons C-C-U and mcm^aa^aU-C-ψ) and of glutamine tRNA (anticodon: C-U-G) from bovine liver. *Nucl. Acids Res.* 12: 2543-2547.
 - 26) 小穴 彪 1951. 日本鶏の歴史. 日本鶏研究社, 東京.
 - 27) Lenstra, J. A., J. A. F. van Bostel, K. A. Zwaagstra and M. Schwerin. 1993. Short interspersed nuclear element (SINE) sequences of the Bovidae. *Anim. Genet.* 24: 33-39.
 - 28) Lessa, E. P. and G. Applebaum. 1993. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Mol. Ecol.* 2: 119-129.
 - 29) Moyzis, R. K., J. M. Buckingham, L. S. Cram, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff and J.-R. Wu. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)_n present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 6622-6626.
 - 30) 向井文雄・塗本雅信 1996. 遺伝的マーカーを用いた量的形質の選抜の有効性. *日畜会報*

- 67: 181-187.
- 31) Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 106: 283-291.
- 32) Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- 33) Nei, M. 1983. Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. In *Evolution of Genes and Proteins*, Sinauer Associates, Sunderland, Mass. pp.165-190.
- 34) 並澤圭二郎・内藤 充・大石孝雄・小宮山健朗 1995. 非破壊変形を指標とした卵殻強度の強弱 2 方向選抜, *家禽会誌* 32: 128-136.
- 35) 農林水産省農林水産技術会議事務局 1994. 家畜ゲノム研究の現状と推進方向: 家畜ゲノム研究の推進について, pp.9-11.
- 36) 農林水産省畜産試験場・農林水産省家畜衛生試験場・幼農林水産先端技術産業振興センター(STAFF) 農林水産先端技術研究所. 1996. 付: DNA マーカーを用いたブタの新育種技術の開発 (研究計画). 交流共同研究「家畜ゲノム解析研究」研究成果集, pp.18-19.
- 37) Oakley, B. R., D. R. Kirsch and R. Morris. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105: 361-363.
- 38) 岡田育穂・豊川好司・高安一郎 1980. 北奥羽在来日本鶏の類縁関係. *家禽会誌* 17: 337-343.
- 39) Okada, L. Y., Yamamoto, T., Hashiguchi and S. Ito. 1984. Phylogenetic studies on the Japanese native breeds of chickens. *Japan. Poult. Sci.* 21: 318-329.
- 40) 岡田育穂・平岡榮一・藤川忠昭・山本義雄・西堀正英・山本哲雄 1993. 高知県における長尾鶏の遺伝学的調査. *家禽会誌* 17: 337-343.
- 41) 岡田育穂・山本義雄・山本興三郎 1995. 越佐三鶏の遺伝子構成. *動遺会誌* 23: 9-12.
- 42) 岡田典弘 1994. レトロポゾンとゲノムの進化. *遺伝* 48 (7): 62-68.
- 43) Orita, M., T. Sekiya and K. Hayashi. 1990. DNA sequence polymorphisms in Alu repeats. *Gemonics* 8: 271-278.
- 44) Ostrander, E. A., P. M. Jong, J. Rine and G. Duyk. 1992. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3419-3423.
- 45) Rinehart, F. P., T. G. Ritch, P. L. Deininger and C. W. Schmis. 1981. Renaturation rate studies of a single family of interspersed repeated sequences in human deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 20: 3003-3010.
- 46) Rogers, J. 1983. CACA sequences - the ends and the means. *Nature* 305: 101-102.
- 47) Rogers, J. S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. In: *Studies in Genetics VII*, University of Texas, University of Texas Publication 7213, Austin, Tex. pp.145-153.
- 48) Saiki, R. K., S. Scharf, F. Fallona, K. B. Mullis, G. T. Horm, H. A. Erlich and N. Amheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- 49) Sakagami, M., K. Oshima, H. Mukoyama, H. Yasue and N. Okada. 1994. A novel tRNA as an origin of short interspersed repetitive elements (SINEs): Equine SINEs may have originated from tRNA^{ser}. *J. Mol. Biol.* 239: 731-735.
- 50) Sakamoto, K. and N. Okada. 1985. Rodent type 2 Alu family, rat identifier sequence, rabbit C family, and bovine or goat 73-bp repeat may have evaluated from tRNA genes. *J. Mol. Evol.* 22: 134-140.
- 51) Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.

- 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- 52) Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
 - 53) Singer, M. F. 1982. SINES and LINEs: high repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* 28: 433-434.
 - 54) Singer, D. S., L. J. Parent and R. Ehrlich. 1987. Identification and DNA sequence of an interspersed repetitive DNA element in the genome of the miniature swine. *Nucl. Acids Res.* 15: 2780.
 - 55) Smith, C. 1967. Improvement of metric traits through specific genetic loci. *Anim. Prod.* 9: 349-358.
 - 56) Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
 - Somerville, L. L. and K. Wang. 1981. The ultrasensitive silver "protein" stain also detects nanograms of nucleic acids. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 102: 53-58.
 - 57) Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
 - 58) Stumph, W. E., P. Kristo, M. J. Tsai and B. W. O'Malley. 1981. A chicken middle-repetitive DNA sequence which shares homology with mammalian ubiquitous repeats. *Nucl. Acids Res.* 9: 5383-5397.
 - 59) Switzer, R. C. III, C. R. Merrill and S. Shifrin. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 98: 231-237.
 - 60) Takahashi, H., T. Awata and H. Yasue. 1992. Characterization of swine short interspersed repetitive sequences. *Anim. Genet.* 23: 443-448.
 - 61) Takahashi, H., K. Nirasawa, T. Furukawa, K. Kikuchi, J. Noguchi, Y. Izaïke and T. Oishi. 1996. Chicken genetic resources in Japan and preservation system in the MAFF gene bank project. *Proceedings of XX World's Poultry Congress-1996*, 4: 60.
 - 62) 田名部雄一・水谷正俊 1980. 本鶏の蛋白質型による品種の相互関係と系統に関する研究. 3. 16 座位から求めた品種間の遺伝的距離と系統樹. *家禽会誌* 17: 116-121.
 - 63) Weber, J. L. 1990. Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Cur. Opin. Biotech.* 1: 166-171.
 - 64) Willard, H. F. and J. S. Wayne. 1987. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet.* 3: 192-198.
 - 65) Wu, W. R. and W. M. Li 1994. A new approach for mapping quantitative trait loci using complete genetic marker linkage maps. *Theor. Appl. Genet.* 89: 535-539.
 - 66) 山田行雄 1978. 育種の原理: 畜産大事典, 養賢堂, 東京. pp. 181-221.

Summary

Studies of DNA markers in Livestock and Poultry

Hideaki TAKAHASHI

Department of Genetic Resources I, National Institute of Agrobiological Resources,
Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

In this thesis, short interspersed repetitive elements (SINEs) in pigs and microsatellite sequences in chickens were molecularly cloned and studied their usages as linkage markers in genetic mapping and understanding of phylogenetic relationship between breeds.

Swine genetic DNA segments containing repetitive sequences were isolated from a porcine genomic library using genomic DNA as a probe. Three fragments containing the repetitive sequences from two of the primary phage clones were subclones for sequence analysis, which revealed six new PRE-1 repetitive families other than those reported earlier by Singer *et al.* (Nucleic Acids Research 15, 2780, 1987). The frequency of PRE-1 sequences in the swine genome was estimated at 2×10^4 per diploid genome. Sequence analysis revealed similarities between these repetitive sequences and that of arginine-tRNA gene.

To detect PRE-1 polymorphisms between breeds and families in pigs, PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism) method (Orita *et al.*, Genomics 8, 271-278, 1990) was used. Nine PRE-1 sequences were amplified by PCR and SSCP of the PRE-1 were examined. PRE-1 polymorphic bands in the polyacrylamide gel were detected using silver staining method (Takahashi *et al.*, Japanese Patent No.1991500). Seven of the nine PRE-1 sequences were polymorphic and the SSCP alleles seemed to be inherited in Mendelian fashion. The results presented the possibility that PRE-1 sequences would be used as linkage markers of genetic analysis.

An efficient method, that is easy to use, for cloning of microsatellite sequences was developed for chickens. Genomic DNA fragments, digested with restriction enzymes, were ligated into pCR-Script SK(+) vector and the ligation mixture was transformed into XL1-Blue MRF competent cells. The cells were infected with helper phage and single-stranded DNA (ssDNA) was prepared by standard procedures except with a modification as follows. After the phage precipitation step, DNaseI and RNaseA were used to remove contaminating *Escherichia coli* DNA and RNA from the resulting ssDNA in the phage mixture. The ssDNA was used as a template for selective second stranded DNA synthesis, primed with (CA)_n oligonucleotide, by thermostable DNA polymerase. Subsequently, ssDNA remaining in the mixture was digested by mung bean nuclease, and the mixture was transformed into XL1-Blue MRF cells. About 70% of the clones in a library enriched for (CA)_n microsatellites with this approach were positive in hybridization analysis using (CA)_n as a probe. Sequence analysis revealed that positive clones contained CA re-

peats and the length of CA repeat units varied between 6 and 28 units with a mean value of 13.1. This method would make the search for new microsatellite DNA polymorphisms more efficient and contribute to genetic mapping of chicken.

Phylogenetic relationships among Japanese native breeds of chickens were studied on the basis of the microsatellite DNA polymorphisms. Six Japanese native breeds (Iwate-Jidori, Aizu-Jidori, Sadohige-Jidori, Siba-Tori, Onaga-Dori and Echigonankin) and one imported breed (White Leghorn) were studied. Since all six microsatellite loci examined were polymorphic, genetic distance could be calculated based on the frequencies of alleles of the microsatellites and phylogenetic relationships among the breeds could be estimated. The results showed that microsatellite sequences are highly polymorphic and useful for studying the genetic relationships of closely related breeds in chickens.